京都大学学術情報リポジトリ
KURENAI 紅
Kyoto University Research Information Repository

京都大学
KYOTO UNIVERSITY

Title	シアノバクテリア概日時計におけるKaiタンパク質間相互作用動態の解析(Dissertation_全文)
Author(s)	合田, 和史
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-03-23
URL	http://hdl.handle.net/2433/198932
Right	本学位論文はTHE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY誌とBioscience, Biotechnology, and Biochemistry誌に掲載された2編の学術論文の内容に基づき書かれたものである。; This research was originally published in THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Kazuhito Goda, Hiroshi Ito, Takao Kondo, and Tokitaka Oyama. Fluorescence correlation spectroscopy to monitor Kai protein-based circadian oscillations in real time. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2012. 287:3241-3248. c the American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Effects of adenylates on the circadian interaction of KaiB with the KaiC complex in the reconstituted cyanobacterial Kai protein oscillator. Kazuhito Goda, Takao Kondo, and Tokitaka Oyama. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2014 78:1833-1838(http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2014.940833)
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

Kyoto University

シアノバクテリア概日時計における Kai タンパク質間相互作用動態の解析

合田和史

目次

要旨 2

序論 4

実験材料と方法 16

結果 23

1）蛍光相関分光法を用いた KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用のリアルタイムモニタリング法の開発 23

2）高温パルス刺激に対する Kai タンパク質振動体の応答 27

3）アデニル酸の添加に対する Kai タンパク質振動体の応答 30

考察 36

参考文献 48

引用文献 49

謝辞 61

要旨

Synechococcus elongatus PCC 7942 は酸素発生型光合成を行う単細胞性のシアノバクテリアであり、細胞レベルの概日時計研究に適したモデル生物として注目されている。分子遺伝学的な解析の結果から *kaiA*、*kaiB*、*kaiC* の 3 遺伝子が概日時計の成立に必須であることが分かり、KaiA、KaiB、KaiC タンパク質と ATP を試験管内で混ぜることでリン酸化 KaiC タンパク質の比率が概日振動することが示された。試験管内で再構成された Kai タンパク質振動体は概日時計の共通した特徴である「自律的な概日振動」、「温度補償性」、「外部環境への同調」を保持することから概日時計の中心に位置すると考えられ、振動体の解析を通して細胞レベルの概日時計の分子機構が解明できると期待されている。

Kai タンパク質振動体では、KaiC タンパク質の持つ ATPase 活性、自己リン酸化活性、自己脱リン酸化活性と 3 つの Kai タンパク質の相互作用が協調して働くことで概日時計の特徴を産み出すと考えられている。KaiB タンパク質はリン酸化 KaiC タンパク質に優先的に相互作用し、リン酸化状態のスイッチングに関わることが知られている。従来の Kai タンパク質間の相互作用はゲルろ過や免疫沈降法、Native-PAGE などの方法で検出されていたが、これらの方法はインキュベーション、サンプル分取、ゲル電気泳動、タンパク質の電気泳動パターンの確認などといった多段階の実験ステップが必要であり、高い時間分解能を持ち数理解析可能な定量データを得ることの妨げとなっていた。

そこで本研究では、Kai タンパク質間の相互作用の働きを解明する取組みとして、Kai タンパク質振動体再構成溶液中における KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用を蛍光相関分光法によりリアルタイムモニタリングする方法の開発に挑戦した。

最初に、部位特異的蛍光標識技術により均一な蛍光標識を施した KaiB タンパ

ク質を調製した。蛍光標識 KaiB タンパク質は振動体再構成溶液に添加しても、リン酸化 KaiC タンパク質の比率の周期的な変化には影響を与えなかった。蛍光相関分光法による解析を行ったところ、約 5 日以上の間、相互作用に由来する並進拡散時間の変化の概日リズムを検出することに成功した。この検出方法は、定量的で非浸襲的なモニタリング法として Kai タンパク質の相互作用の機能解明に重要なツールとなることが期待できる。

続いて、本モニタリング法を用いて概日時計の特徴の 1 つである「外部環境への同調」における周期的な相互作用の動態観測を試みた。シアノバクテリアは温度や光環境の変化に対して概日時計を同調させることが知られている。Kai タンパク質振動体に高温のパルス刺激を与えたところ、周期的な相互作用の変動が刺激を与えた特定の時刻に依存して位相応答することが観測できた。全体として約 5 日間の相互作用の周期的変化を観測すると同時に刺激直後の位相応答変化の遷移過程を 10 分ごとの短いインターバルで観測することができ、同調過程が刺激直後に速やかに進行する様子が明らかになった。また、光環境への同調を観測するために、シアノバクテリア内で光環境下に応答する ATP と ADP の濃度を変化させ、周期的な相互作用の変動を検出した。ADP の添加による周期長の変化と位相応答が起こる様子を定量的なデータを基に行った数理解析から明らかにすることができた。

以上の通り、本法は再構成溶液中での Kai タンパク質間相互作用に関する定量的で数理解析可能なデータを高い時間分解能で取得できるリアルタイムモニタリング法であり、「外部環境への同調」過程における相互作用の動態観測に用いることができた。今回得られた知見を基に Kai タンパク質間相互作用の幅広いタイムスケールでの挙動と KaiC タンパク質の酵素活性や構造変化の関係が明らかになり、細胞レベルの概日時計の理解が進むことが期待できる。

序論

生物は刻々と変動し続ける外部環境に適応するために様々な制御システムを内部に構築している。植物やシアノバクテリアなどの光合成生物は光合成により光エネルギーを化学エネルギーに変換することで生育する独立栄養性の生物である。光合成生物は光エネルギーを効率的に利用するために、光条件に適応した制御システムを発達させてきた。植物が発達させた制御システムの１つが光受容体による光受容から転写因子による光合成関連遺伝子の転写誘導に繋がるシグナル伝達系である。以前に、筆者らはモデル植物であるシロイヌナズナにおいて光受容体の下流で働く転写因子であるHY5タンパク質の機能解析を行い、HY5タンパク質のリン酸化の状態が芽生え時の光形態形成を制御していることを明らかにした（**参考文献 Hardtke *et al.*, 2000**）。光エネルギーの源である太陽は地球の自転に伴い地球の表面における１日周期の昼夜リズムを作り出す。光合成生物は１日周期の環境変化を積極的に予測し、適応するために概日時計と呼ばれる制御システムを発達させてきた。光合成関連遺伝子は概日時計による制御も受け、その変動が概日リズムを示すことが知られている（Millar *et al.*, 1992）。概日時計は、光合成生物だけでなく多くの生物に存在する。ヒトでの睡眠と覚醒、ショウジョウバエの羽化などに代表される動物の行動や発生、それらに伴う代謝活性、遺伝子発現などの変化は概日時計によって制御されている生理反応である（Panda *et al.*, 2002）。多様な生物種における幅広い生理反応を制御する概日時計には３つの共通した特徴が存在することが知られている（Johnson *et al.*, 2004）。１つ目は、概日時計が一定の外部環境下において安定した周期の振動を示すこと（自律的な概日振動）。２つ目は、異なる温度条件においても概日時計の周期長が変化しないこと（温度補償性）。３つ目は、外部環境の変動に応じて概日時計が同調すること（外部環境への同調）である。これ

らの 3 つの特徴はその一般性から概日時計の根幹を担うと考えられており、細胞内のどのような分子がどのような機構で制御システムを機能させているかを理解することは大変に興味深い。

シアノバクテリアを用いた概日時計の研究

シアノバクテリアにおける概日リズムの存在が明確に示されたのは、1986 年である。一部の単細胞性シアノバクテリアにおいては、光合成によって酸素を発生する一方で、酸素の存在下で活性が大きく阻害される窒素固定反応を 1 つの細胞内で行っている。Grobbelaar らと Mitsui らはそれぞれ独立に単細胞性の *Synechococcus* を用いて窒素固定反応を担うニトロゲナーゼの活性が夜間において高くなり光合成活性と時間的に隔離されている事、更にはニトロゲナーゼの活性が一定の明環境下においても概日リズムを示す事を明らかにした（Grobbelaar *et al.*, 1986; Mitsui *et al.*, 1986）。

シアノバクテリアを用いた概日時計の分子機構の解析には、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 が大きな役割を果たしている。*Synechococcus elongatus* PCC 7942 は単細胞性のシアノバクテリアであり、ゲノムサイズの小ささや形質転換が容易なことから概日時計の分子機構を細胞レベルで理解するのに適したモデル生物として考えられている（Golden *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2011）。1993 年近藤らは光化学系 II の反応中心のタンパク質をコードする *psbA1* 遺伝子の発現が一定の明環境下において概日リズムを示すことを明らかにした（Kondo *et al.*, 1993）。更に、*psbA1* 遺伝子のプロモーターにバクテリア型発光遺伝子を繋いだ遺伝子を導入した系統を作成し、この系統が発する発光シグナルを記録することで、遺伝子発現の概日リズムを非浸襲的にリアルタイムで自動検出する方法を開発した（Kondo *et al.*, 1993）。発光シグナルの変動は、概

日時計の持つ 3 つの特徴である「自律的な概日振動」、「温度補償性」、「外部環境への同調」を有しており、内在性の概日時計を反映していることを示していた。従来の経時的な遺伝子発現変動の検出は、データポイントごとのサンプリングや核酸検出までの実験ステップの多さから、多くの手間と時間が掛かっていた。とりわけ、概日リズムのように昼夜に跨り長期間のサンプリングを必要とする実験では、実験者は過大な負荷に苦しんでいた。近藤らの開発した方法は、そのような煩雑な作業の省力化を可能にし、その後のシアノバクテリアでの細胞レベルの概日時計研究における強力なツールとなった。

kai 遺伝子の発見

石浦らは、上記の発光シグナルを用いた効率的なリアルタイム遺伝子発現検出法を用いて得られた変異体の解析から、3 つの時計遺伝子 *kaiA*、*kaiB*、*kaiC* の単離に成功した（Ishiura *et al.*, 1998）。3 つの *kai* 遺伝子の内、どの 1 つの遺伝子を破壊しても遺伝子発現の概日リズムが消失することから、*kai* 遺伝子群は概日時計に必須であると考えられた。3 つの *kai* 遺伝子は染色体上において隣接しており、*kaiA* 遺伝子は単独で *kaiB*、*kaiC* 遺伝子は一続きのオペロンとして転写される。また、それぞれのプロモーター活性は概日リズムを示す。*kaiBC* オペロンの転写は、*kaiC* 遺伝子を過剰発現させることで抑制された。一方で、*kaiA* 遺伝子の過剰発現は *kaiBC* のプロモーター活性を促進した。これらの結果から 3 つの *kai* 遺伝子の転写/翻訳を介したフィードバックループを概日時計の中心とする制御モデルが提唱された（Ishiura *et al.*, 1998）。転写/翻訳のフィードバックループモデルは、ショウジョウバエやアカパンカビでも同様に提唱されており、概日時計の一般的な制御モデルであると考えられていた。これをきっかけにして概日時計が持つ制御機構を理解するために、3 つの *kai* 遺伝子の働

きを分子レベルで解明しようとする一連の研究が花開くことになる。

kaiA 遺伝子、*kaiB* 遺伝子、*kaiC* 遺伝子は、それぞれ 284、102、519 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた。KaiA タンパク質は、N 末端に偽レシーバードメインを持ち、2 量体を形成する（Ye *et al.*, 2004）。KaiB タンパク質は、チオレドキシン様の構造を取り、2 量体と 4 量体を形成する（Hitomi *et al.*, 2005; Iwase *et al.*, 2005）。KaiC タンパク質は 6 量体を形成し、2 つの ATP 結合ドメインと自己リン酸化活性、自己脱リン酸化活性を持つことが示された（Hayashi *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2002; Nishiwaki *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003）。シアノバクテリアの細胞内では、KaiB タンパク質、KaiC タンパク質の蓄積量と更にはリン酸化 KaiC タンパク質の比率は概日リズムを示す（Iwasaki *et al.*, 2002; Kitayama *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2000; 図 1）。KaiC タンパク質の持つ Ser-431 と Thr-432 の 2 箇所のリン酸化サイトは、どちらをリン酸化されない Ala 残基に置き換えても *kaiBC* のプロモーター活性の概日リズムを消失させた（Nishiwaki *et al.*, 2004）。この事から KaiC タンパク質のリン酸化が細胞内の概日時計に重要であると考えられた。KaiC タンパク質の自己リン酸化は細胞内と試験管内の両方で KaiA タンパク質によって促進されることが示された（Iwasaki *et al.*, 2002）。一方で、KaiB タンパク質は KaiA タンパク質による KaiC タンパク質の自己リン酸化の促進を阻害することが分かった（Iwasaki *et al.*, 2002; Kitayama *et al.*, 2003）。細胞内において KaiC タンパク質は他の Kai タンパク質と共に複合体を形成する（Kageyama *et al.*, 2003）。複合体のサイズは、夜間の時間帯において大きくなり 400-600 kDa の高次複合体を形成することがわかった。また、KaiC タンパク質のリン酸化は他の Kai タンパク質との複合体形成に影響を与えることが明らかにされた（Nishiwaki *et al.*, 2004; 図 1）。

3つのKaiタンパク質間の相互作用やKaiCタンパク質のリン酸化や酵素活性、遺伝子発現などについて多くの知見が集まる一方で、機能様式の異なる各構成要素が、細胞内においてどのように組み合わさって機能することで制御システムを形成し、概日時計の一般的な特徴を示すか？という疑問に対する回答を得るには至っていなかった。そのような状況の中、2005年に冨田らが示した暗所下でのリン酸化KaiCタンパク質の比率の変動結果がブレークスルーのきっかけとなった（Tomita *et al.*, 2005）。暗所下において*kai*遺伝子群の転写を大きく減衰させた時に、細胞内のリン酸化KaiCタンパク質の比率を調べると、その変動は頑強な概日リズムを示した。この結果は、転写/翻訳を介したフィードバックループには依存しないKaiCタンパク質のリン酸化に関わる振動体が存在することを示唆している。更に、驚くべきことに、中島らはKaiAタンパク質、KaiBタンパク質、KaiCタンパク質の3つのタンパク質とATPを混合することで、試験管内においてリン酸化KaiCタンパク質比率の概日リズムを再構成することに成功した（Nakajima *et al.*, 2005; 図1）。3つのKaiタンパク質は、他のタンパク質が存在せず、また自身の転写/翻訳のフィードバックループが存在しない環境において振動体を構成したのである。試験管内で再構成されたKaiタンパク質振動体は、上に述べた概日時計の3つの特徴、即ち「自律的な概日振動」、「温度補償性」、「外部環境への同調」を保持しており、転写/翻訳のフィードバックループとは異なる制御要素が概日時計の中心的な振動体であることが明らかになった（Nakajima *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009）。試験管内において再構成したKaiタンパク質振動体を手にしたことで中心的な振動体の機能を直接に調べることが可能になり、概日時計の3つの特徴を産み出す分子機構の解析が飛躍的に進んでいる（Ito *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 2007; Rust *et al.*, 2011; Terauchi *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009）。

Kai タンパク質の機能解析

Kai タンパク質振動体の解析で注目を浴びている制御システムの構成要素の 1 つとして KaiC タンパク質の ATPase 活性と自己リン酸化活性が挙げられる（Terauchi *et al.*, 2007）。KaiC タンパク質は、試験管内において KaiA タンパク質、KaiB タンパク質の非存在下で 1 分子辺り約 15 個の ATP を 1 日に分解する活性を示した。この ATPase 活性は、概日時計の特徴である「温度補償性」を持つことが分かった。更には *kaiC* 遺伝子の周期長変異体が示す細胞内の概日リズムの周期長の逆数（振動数）と各変異型遺伝子がコードする変異型 KaiC タンパク質の示す ATPase 活性が密接な相関関係を示したことから、概日時計の針は ATP の分解によって生じるエネルギー（仕事率）が進行速度を決めていると考えられた。試験管内において、KaiA タンパク質と KaiB タンパク質は、KaiC タンパク質の ATPase 活性をそれぞれ促進的と抑制的に制御した。Kai タンパク質振動体再構成溶液中では、KaiC タンパク質の ATPase 活性は概日振動し、その位相は KaiC タンパク質の自己リン酸化活性と同じであった（図 1）。これらの結果から Kai タンパク質間の相互作用と周期長を決定する KaiC タンパク質の酵素活性がカップリングしているモデルが提唱された。このような Kai タンパク質振動体の重要な制御要素である周期的な KaiC タンパク質の ATPase 活性の変動は、各データポイントにおいてサンプリングした溶液を HPLC により ADP を定量分析した値から評価されていた（Terauchi *et al.*, 2007; 表 1）。また、再構成溶液中における KaiC タンパク質の酵素活性に伴う立体構造変化を、トリプトファンの持つ自家蛍光強度の変動を検出することでリアルタイムにモニタリングする方法も開発された（Murayama *et al.*, 2011; 表 1）。

Kai タンパク質振動体の詳細な解析により、Kai タンパク質間の相互作用の果

たす役割が明らかにされつつある。Kai タンパク質振動体再構成溶液中においても、3 つの Kai タンパク質は細胞内と同様に KaiC タンパク質複合体を中心とした周期的な相互作用の変動を示す（Kageyama *et al.*, 2003; Kageyama *et al.*, 2006; 図 1）。KaiA タンパク質は振動体の 1 周期を通して約 95%が複合体中に存在していた。KaiA タンパク質と KaiC タンパク質は速く繰り返し結合することで、KaiC タンパク質のリン酸化を促進するモデルが提唱された（Kageyama *et al.*, 2006）。KaiB タンパク質はリン酸化 KaiC タンパク質に優先的に結合し、複合体形成は概日リズムを示す（Kageyama *et al.*, 2006; 図 1）。KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用は、KaiC タンパク質のリン酸化から脱リン酸化へのスイッチとして働くことが分かった。KaiC タンパク質複合体は KaiC タンパク質複合体同士で相互作用し、単量体の交換反応を行うことが明らかになった（Kageyama *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2007）。Kai タンパク質間の様々な組み合わせにおいて観察されるダイナミックな相互作用の変化が Kai タンパク質振動体の各位相において様々な機能を果たしている（Kageyama *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2007）。KaiC タンパク質の状態変化や酵素活性と協調した Kai タンパク質間相互作用のダイナミクスは、概日時計が自律的に概日振動を維持し、且つ刻々と変化する外部環境に同調するために構築した制御システムの構成要素であり、幅広い時間スケールに跨った機能様式の理解が求められる。従来の Kai タンパク質間の相互作用解析には、ゲルろ過や免疫沈降法、Native-PAGE などの方法が使用されていた。これらのどの方法もインキュベーション、サンプル分取、ゲル電気泳動、タンパク質の電気泳動パターンの確認などといった多段階の実験ステップが必要とされる（表 1）。多段階の実験ステップからなる相互作用の解析には時間や手間が掛かり、定量化され高い時間分解能でとられた経時変化のデータを得ることの妨げとなっていた。最近になり、

X 線小角散乱法などを利用した Kai タンパク質複合体のリアルタイムモニタリングなども行われているが、高価で特別な装置を用い、且つ必要なサンプル量も多いためにルーティン解析には適していない（Akiyama *et al.*, 2008; Murayama *et al.*, 2011）。

解析方法	検出対象	手順	浸襲性	装置	コスト
SDS-PAGE	P-KaiC	多い	浸襲	汎用器具	低い
ゲルろ過(+SDS-PAGE)	PPI	多い	浸襲	汎用器具	低い
BN-PAGE(+SDS-PAGE)	PPI	多い	浸襲	汎用器具	低い
IP (+SDS-PAGE)	PPI	多い	浸襲	汎用器具	低い
電顕観察	複合体の立体構造	多い	浸襲	電子顕微鏡	高い
SAXS	複合体の立体構造	多い	非浸襲	X 線加速装置	高い
蛍光相関分光法（本研究）	PPI	少ない	非浸襲	蛍光相関分光装置	中間
Trp 蛍光	KaiC 構造変化	少ない	非浸襲	高精度分光装置	低い
ATP/ADP 定量	ATPase 活性	少ない	浸襲	HPLC	低い

表 1　Kai タンパク質振動体における各制御要素の振動変化を検出する方法

Kai タンパク質振動体再構成溶液中でのリン酸化 KaiC タンパク質の量、タンパク質間相互作用、KaiC タンパク質の構造変化、KaiC タンパク質の ATPase 活性などの振動的変化を検出する方法を比較した。それぞれ、BN-PAGE は Native-PAGE の 1 種、IP は免疫沈降法、SAXS は X 線小角散乱法、Trp 蛍光はトリプトファンの自家蛍光、P-KaiC はリン酸化 KaiC タンパク質の比率、PPI は Kai タンパク質間の相互作用を示している。

蛍光相関分光法

蛍光分析技術では反応溶液中のタンパク質間相互作用を遊離状態と結合状態

を分離することなくリアルタイムで検出することが可能である（Krichevsky *et al.*, 2002; Piehler *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2003）。蛍光分析技術の 1 つである蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS）は共焦点光学系を用いて、蛍光標識分子の濃度の低い溶液中における分子の濃度と動きの特徴を検出することができる極めて感度の高い方法である（図 2; Chowdhury, 2011; Krichevsky *et al.*, 2002）。従来の蛍光分析法の多くが溶液中で平均化された蛍光分子のシグナルを検出しているのに対して、蛍光相関分光法では共焦点光学系を利用して検出領域をフェムトリットル（10^{-15} L）レベルにまで狭める事で分子レベルの蛍光シグナルの揺らぎを検出することができる（図 2A）。例えば、蛍光相関分光法で 1 nM の蛍光分子溶液を測定すると 1 フェムトリットルの検出領域には平均して約 0.6 個の分子が存在することになり、検出される蛍光シグナルには蛍光分子 1 分子の特徴が反映される。試験管内の蛍光分子はブラウン運動のランダムな動きにより検出領域に出入りする（図 2B）。分子量が小さく速く拡散する分子は蛍光シグナルの「揺らぎ」が速い変化として検出され、分子量が大きく遅く拡散する分子は蛍光シグナルの「揺らぎ」が遅い変化として検出される。計測時間中の蛍光シグナルの「揺らぎ」は自己相関関数によって解析され、溶液中の蛍光分子の濃度と並進拡散時間の値が算出される（図 2C; 「実験材料と方法」を参照）。並進拡散時間は、蛍光分子のサイズを反映した検出領域中における分子の存在確率に関連した値である。Stokes-Einstein の式によると、溶液中でブラウン運動をしている球状分子の並進拡散時間は分子量の 3 乗根に比例すると考えられる（「実験材料と方法」を参照）。

このような蛍光相関分光法の解析原理を基にして、試験管内での分子間相互作用や生体分子の定量などが結合状態と遊離状態を分離するという実験ステップを行うことなく、直接に解析されている（Krouglova *et al.*, 2004; Watabe *et*

al., 2011)。図 2C には、分子間相互作用の検出例を模式的に表した。まず、分子間相互作用の対象となる分子の X を蛍光標識する。次に X 単独で存在する溶液とその溶液に対して相互作用のパートナーとなる分子 Y を蛍光標識せずに添加した溶液を準備する。X 単独で存在する溶液中では蛍光相関分光法で検出される蛍光分子は、分子量が小さく早い拡散運動を示す X のみである。一方で、Y を添加した溶液中には相互作用を起こした複合体 XY が蛍光分子として存在し、分子量が大きく遅い拡散運動を示す。蛍光相関分光法では、X 単独で存在する溶液と X に加え XY も同時に含まれる溶液では、それぞれ短い並進拡散時間と長い並進拡散時間が算出される。このように並進拡散時間の増大は、蛍光分子複合体のサイズの増大もしくは遊離している蛍光分子に対する複合体に含まれる蛍光分子の割合の増大を反映する（図 2C)。筆者らは本研究で蛍光相関分光法による計測及び解析に用いたオリンパス社製の一分子蛍光分析装置 MF20（図 2D）の仕様検討などに携わってきた。この装置は生体分子の分子間相互作用や SNP の genotyping などの用途で使用されており、筆者らは蛍光相関分光法を用いて糖ペプチドとタンパク質間の相互作用の検出や siRNA の定量法の開発などを行ってきた（**参考文献 Abe *et al.*, 2009; 参考文献 Hagiwara *et al.*, 2007**; Bannai *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2008)。

ここまでに述べたように、シアノバクテリアでは Kai タンパク質間相互作用の動態が概日時計の機能発現に大きな役割を果たしている。そこで、本研究では Kai タンパク質間相互作用の幅広い時間スケールに跨った機能を詳細に理解する事を目指し、蛍光相関分光法を用いた Kai タンパク質振動体再構成溶液における KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用のリアルタイムモニタリング法の開発を行った。KaiB タンパク質の KaiC タンパク質複合体に対

する結合及び解離の反応は、KaiC タンパク質の自己リン酸化活性と自己脱リン酸化活性を切り替える上で必須のステップである。また、Kai タンパク質振動体再構成溶液において、その相互作用は明瞭な概日リズムを示している。KaiC タンパク質複合体と結合していない KaiB タンパク質と結合している KaiB タンパク質は分子量が著しく異なる。先行研究におけるゲルろ過解析では、遊離型 KaiB タンパク質と結合型 KaiB タンパク質はそれぞれ約 25 kDa と約 500 kDa の位置に溶出された（Kageyama *et al.*, 2006）。以上に示した KaiB タンパク質の相互作用の特徴は蛍光相関分光法に適していると予想されたため、蛍光標識した KaiB タンパク質を Kai タンパク質振動体再構成溶液に添加し、その挙動をリアルタイムにモニタリングすることに挑戦した。その結果、約 5 日間にわたり KaiB タンパク質の相互作用の概日リズムを非浸襲的且つ定量的に検出することができたので報告する。

本モニタリング法を用いた再構成溶液の解析では、任意の時間に外部から与えた刺激の前後の KaiB タンパク質の相互作用の変動を追跡することが期待できる。そこで、概日時計の特徴の 1 つである「外部環境への同調」の過程の追跡を試みた。シアノバクテリアの概日時計は温度変化や光環境に対して同調することが知られている（Golden *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 2002）。最近、Kai タンパク質振動体再構成溶液中のリン酸化 KaiC タンパク質の概日リズムも高温のパルス刺激に対して、直接に同調することが示された（Mori *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009）。光エネルギーは、シアノバクテリア内において光合成により化学エネルギーへと変換される。この過程において ADP から ATP が合成され、昼夜の明暗環境に応答して細胞内の ATP/ADP の比率が変化する。最近、Rust らは ATP/ADP の比率変化が Kai タンパク質振動体中の KaiC タンパク質のリン酸化リズムをリセットすることを示し、ADP が KaiC タンパク質の自己

リン酸化活性に関する ATP の競合阻害能を示すとしたモデルを構築し同調過程に適用した（Rust *et al.*, 2011）。これらの温度変化や ATP/ADP の濃度変化への同調機構を理解するためには、Kai タンパク質間の相互作用が同調過程においてどのような挙動を示すかということを観測する必要がある。本研究では、再構成溶液に対して、温度変化刺激や ATP/ADP 濃度比率の変化を与えて、KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用の動態に対する影響を調べた。これらの外部刺激に関して、相互作用の振動変化の同調が観測され、幅広い時間スケールに跨った定量的なデータを得ることができたので、併せて報告する。Kai タンパク質振動体における Kai タンパク質間相互作用の動態と KaiC タンパク質の酵素活性や構造変化の関係を基にして、細胞レベルの概日時計の構造や機能について考察する。

実験材料と方法

1) KaiA、KaiB、KaiC タンパク質の調製

組換え KaiA、KaiB、KaiC タンパク質は名古屋大学近藤研究室において中嶋らの方法に従い調製された試料を使用した（Nakajima *et al.*, 2005）。

2) 蛍光標識 KaiB タンパク質プローブの調製

試験管内での蛍光標識 KaiB タンパク質プローブの調製は以下の手順で進めた。まず *Synechococcus elongatus* PCC 7942 の *kaiB* 遺伝子を pROX-FL プラスミドの *Nde*I 部位と *Not*I 部位の間に挿入した（Ishiura *et al.*, 1998; Abe *et al.*, 2010）。pROX-FL プラスミドはオリンパス社製 In vitro Pin-point Fluorescence Labeling Kit 543 の一部であり、このプラスミドを使うことで N 末端に TAMRA-X-aminophenylalanine (4-((6-(tetramethylrhodamine-5-(and-6)-carboxamido)hexanol)amino)phenyl alanine)を含むアミノ酸残基と C 末端にタンパク質精製のためのヒスチヂン残基を含む蛍光タンパク質を試験管内で合成することができる。N 末端のアミノ酸残基は ATGTCTAAACAAATCGAAGTAAACCGGGTCTAATGAG の DNA 塩基配列でコードされている。下線を引いた CGGG の 4 塩基は TAMRA-tRNA (TAMRA-X-aminophenylalanyl-tRNA$_{CCCG}$)のための人工的なコドンとして機能する。CGGG の代わりに CGG の 3 塩基コドンが認識された時には、下流のストップコドンにより翻訳が終結する。TAMRA-tRNA を用いた試験管内でのタンパク質合成には RTS 100 *E. coli* HY kit (Roche diagnostics 社製)を使用した。反応溶液の調製は上記 Kit 中の取扱説明書に従って行い、30°C で 2 時間反応させた。合成反応後の溶液は His Spin Trap Column (GE Healthcare 社製)

で精製した。ヒスチヂン残基を持つ完全長の蛍光標識 KaiB タンパク質のみがアフィニティーカラムにのみトラップされるので、4 塩基コドンを認識しなかった不完全なペプチドはこの精製処理によって除去される。精製処理後、ゲルろ過カラム PD-10 (GE Healthcare 社製)を用いて保存バッファを Tris バッファ（20 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 mM EDTA、100 mM NaCl）に交換した。蛍光標識 KaiB の濃度は蛍光相関分光法により算出した（Krichevsky and Bonnet, 2002）。

3) SDS-PAGE

蛍光標識 KaiB タンパク質プローブの調製を確認するための SDS-PAGE は 10-20 %の濃度勾配ゲル （PAGEL NPG-R1020L、Atto 社製）を用いて行った。ゲルろ過による精製後の TAMRA 標識 KaiB タンパク質溶液をゲルにアプライした。電気泳動後のゲル中の TAMRA 由来の蛍光シグナルは、Typhoon 9400 gel-imaging system（GE Healthcare 社製）の設定から 532 nm の励起波長と 580BP30 の蛍光フィルターを選択して、読み取った。タンパク質の分子サイズを推定するために、Prestained XL-ladder Broad プロテインマーカー （APRO 社製）を使用した。

溶液中の KaiC タンパク質のリン酸化状態を確認するための SDS-PAGE は、N, N'-メチレンビスアクリルアミドの混合比 0.67 %の 11 %のアクリルアミドゲルを用いて行った（Nishiwaki *et al.*, 2007）。電気泳動の装置は EPL156DA （Advantec 社製）もしくは NA-1012L（日本エイドー社製）を使用した。泳動後のゲルは Quick-CBB PLUS（和光純薬社製）で染色した。バンドの定量測定は較正済み濃度計 GS-800（BioRad 社製）と画像解析ソフトウェア ImageJ 1.33v （National Institute of Health）を用いて行った。

4) Kai タンパク質振動子の試験管内再構成

KaiA、KaiB、KaiC タンパク質からなる振動体の試験管内再構成は中嶋らの方法に従って調製した（Nakajima *et al.*, 2005）。一分子蛍光分析装置 MF20(オリンパス社製、図 2D)の庫内温度は 28°C で一定となるように調整した。従来の試験管内再構成溶液は 30°C で反応させる事が一般的であったが、装置の安定性を考えて 28°C を採用した。

5) 蛍光相関分光法の計測

蛍光相関分光法は一分子蛍光分析装置 MF20 (オリンパス社製、図 2D)を用いて行った。この装置では、励起用の 543 nm He-Ne レーザーを使用して専用の 384 ウェルガラスボトムプレート（オリンパス社製)中のサンプル溶液を計測することができる。励起用のレーザー光は干渉フィルターで 100 μW に調整され、水浸対物レンズにより専用プレートのウェルの中央で底面から 100 μm の位置に集光される（図 2A)。この時の共焦点領域の体積は約 1 fl になる。サンプル溶液から放射される蛍光は同じ対物レンズで集光され、HQ 590/60 の干渉フィルター（Chroma Technology）を通過した光のみが検出器に到達する。検出器に記録された蛍光シグナルは蛍光相関分光法の 1 成分解析モデルもしくは 2 成分解析モデルに従って解析した（後述)。蛍光相関分光法に用いたサンプル溶液の総量は、30-50 μl の間である。一連の計測中は、サンプルの蒸発防止のためにプレートにシールを貼った。各データポイントの計測時間は、実験ごとに特別に記載した場合を除き、15 秒計測を 10 回行った。

6) 蛍光相関分光法の解析

一分子蛍光分析装置 MF20 では、計測後に得られた蛍光シグナルを蛍光相関分光法の 1 成分解析モデルもしくは 2 成分解析で解析することができる。蛍光相関分光法では次式の通り、蛍光強度の時間変化による「揺らぎ」を自己相関関数の形で算出して解析する。

$$G(\tau)=\frac{\langle I(t)I(t+\tau)\rangle}{\langle I(t)^2\rangle}$$

溶液中でブラウン運動をしている蛍光標識分子は検出領域内の個数と並進拡散時間によって特徴付けられる。自己相関関数の 1 成分解析モデル、2 成分解析モデルは次式の通りに蛍光分子の個数、各成分の分子の存在比、各成分の並進拡散時間を含んだ式で表すことができる（Chowdhury, 20011; Hori *et al.*, 2003）。

1 成分解析モデル

$$G(\tau)=1+\frac{1}{N}\left[\frac{1}{(1+\frac{\tau}{\tau_D})(1+\frac{\tau}{c^2\tau_D})^{1/2}}+\frac{T}{(1-T)\cdot e^{\tau/\tau_T}}\right]$$

2 成分解析モデル

$$G(\tau)=1+\frac{1}{N}\left[\frac{y}{(1+\frac{\tau}{\tau_{free}})(1+\frac{\tau}{c^2\tau_{free}})^{1/2}}+\frac{1-y}{(1+\frac{\tau}{\tau_{complex}})(1+\frac{\tau}{c^2\tau_{complex}})^{1/2}}+\frac{T}{(1-T)\cdot e^{\tau/\tau_T}}\right]$$

ここでは各変数や定数は以下のように定義される。Nは共焦点領域中の蛍光粒子の総数である。τ_Dは蛍光標識分子の並進拡散時間である。cは共焦点領域の構

造パラメータである。Tは三重項状態にある蛍光標識プローブの割合である。τ_Tは三重項状態にある蛍光標識プローブの寿命である。yは結合していない遊離状態にある蛍光標識分子の割合である。τ_{free}は遊離状態にある蛍光標識分子の並進拡散時間である。$\tau_{complex}$は結合状態にある蛍光標識分子の並進拡散時間である。並進拡散時間の値は拡散定数 D と以下の関係にある。

$$\tau_D = \frac{\omega^2}{4D}$$

ここではωは上に表れたcとは異なる共焦点領域の構造パラメータを表している。拡散定数 D は、溶液中を拡散する球状分子を仮定した場合に以下の Stokes-Einstein の式によって表される。

$$D = \frac{\kappa_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

ここではκ_Bはボルツマン定数、Tは絶対温度、ηは溶媒の粘性、r は球状分子の半径を表している。上の 2 つの式と r が分子量の 3 乗根と比例関係にあることから、球状分子という仮定の元において並進拡散時間τ_Dは分子量の 3 乗根に比例すると考えることができる。

2 成分解析モデルを利用した各データポイントにおける Kai タンパク質振動体再構成溶液内の結合した蛍光標識プローブの割合の算出は以下の通りに行った。最初に、再構成溶液を 1 成分解析モデルで解析して得たプローブの並進拡散時間がピークに達する時点（インキュベーション開始から 9.4 時間後、図 4D）での蛍光色素溶液と KaiB タンパク質と蛍光標識プローブの混合溶液を 1 成分解析モデルで解析し、c (4.3 ± 0.3)とτ_{free} (482.5 ± 16.6 μs) の値を決定した。次に、ピーク時の再構成溶液を 2 成分解析モデルで解析し、$\tau_{complex}$ (1243.0 ± 256.9 μs) を算出した。最後に、各データポイントにおけるyを算出するために、ピーク

時に算出された$\tau_{complex}$を各データポイントとピーク時の蛍光色素の並進拡散時間の割合を使って補正した値を使って 2 成分解析モデルで解析し、yの値を得た（図 5B）。

7) 高温パルス刺激実験

高温パルス刺激として、再構成溶液を一分子蛍光分析装置から取り出して、50°C で 30 分間処理した。その後、28°C で 10 分間冷やした後に、再度、蛍光相関分光法による計測を再開した。

8) アデニル酸添加実験

アデニル酸の添加は、50 mM の ATP もしくは ADP ストック溶液を再構成溶液に加えることで行った。図 12 に示した ATP/ADP 比率を下げる実験では、ADP のストック溶液を最終濃度が 4 mM となるように異なるタイミングで添加した。コントロールとしては、同じ容量の蒸留水を添加した。

9) 概日リズムのパラメータの数理解析

ATP/ADP 比率を下げる実験では、蛍光相関分光法により得られた並進拡散時間の値を数理解析し、再構成溶液中の KaiB タンパク質の相互作用の概日変動の特徴を評価した。最初に、並進拡散時間の時系列データを次式にあてはめて正弦曲線に適合させた。

$$Diff.\ Time = y0 + (Amplitude) \times \sin(2\pi \times (t - \phi) / \tau)$$

ここでは各変数や定数は以下の様に定義される。$y0$ はオフセット値である。t はインキュベーション開始からの時間である。ϕは振動の位相である。τは振動

の周期である。正弦曲線への適合は統計解析ソフトである Origin 8J（OriginLab 社製）を用いて非線形最小二乗法を用いて行った。振動の位相はピーク時間を基準にして、再計算した（表 2)。周期の異なる各振動の位相を比較するために次の定義に従い、“概日時間”（circadian time）の概念を導入した（Spoelstra *et al.*, 2004)。ある振動の“概日時間”はその振動の周期を２４分割した時間が単位時間として定義される。サンプル S の時間 t における位相 $\psi_S(t)$ は次式によって定まる。

$$\psi_S(t) = [(t - \phi_S) \times 24 / \tau_S] \bmod 24$$

ここでの t、ϕ_S、τ_S は通常の時間であり、上述の定義に従う。$\psi_S(t)$ は “概日時間”である。ADP 添加によって生じる位相シフトの量は次式によって計算した。

$$\text{Phase shift} = \psi_S(T) - \psi_{Scont}(T)$$

ここでは、Scont は ADP を添加してないコントロールを意味する。また、T はサンプル S に対して ADP を添加した時のインキュベーション開始からの（通常の）時間である。位相応答曲線の位相シフトの量は“概日時間”の−12 から+12 の範囲の値で表現した。

結果

1) 蛍光相関分光法を用いた KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用のリアルタイムモニタリング法の開発

(a) 蛍光標識 KaiB タンパク質プローブの調製

蛍光標識 KaiB タンパク質プローブを調製するために、人工コドンを利用した部位特異的蛍光標識アミノ酸導入法を使用した（図 3A; Abe *et al.*, 2010; Hohsaka *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 2009）。この方法を用いることで、タンパク質分子の同じ箇所のアミノ酸残基に対して 1 つずつ蛍光基を付加させるような均一な蛍光標識が可能になる。タンパク質発現に用いるプラスミドは、KaiB タンパク質をコードする DNA 塩基配列の 5'側上流に 4 塩基コドン（5'-CGGG-3'）を含む配列が、3'側下流に His_6 タグをコードする配列が付加されている（Abe *et al.*, 2010）。蛍光標識 KaiB タンパク質プローブは無細胞タンパク質合成系により合成した。TAMRA-X-aminophenylalanine 残基をタンパク質に導入するために、4 塩基コドンを認識する TAMRA-X-aminophenylalanyl-tRNA を反応溶液に添加した（「実験材料と方法」を参照）。蛍光標識されたタンパク質が合成されていることを確認するために、反応後の溶液を SDS-PAGE にかけて、泳動後のゲルを蛍光イメージングした。TAMRA に由来する蛍光シグナルが約 15 kDa の位置に検出され、TAMRA-KaiB-His_6 の完全長として推定された分子量（約 15.8 kDa）と一致した（図 3B）。

次に、合成した TAMRA-KaiB-His_6 が Kai タンパク質振動体再構成溶液に与える影響を評価した。再構成溶液の標準的な組成には、1.2 μM の KaiA タンパ

ク質と 3.5 μM の KaiB タンパク質、3.5 μM の KaiC タンパク質及び 1 mM の ATP が含まれる。この再構成溶液を 30°C で 60 時間インキュベーションしたところ、従来の報告と同様に、リン酸化 KaiC タンパク質の量が約 22 時間周期の頑強な振動を示した（図 3C 白丸; Nakajima *et al.*, 2005）。同時に TAMRA-KaiB-His_6 を最終濃度が 1 nM になるように添加した再構成溶液も準備した。1 nM の蛍光分子濃度の溶液は蛍光相関分光法による解析が可能である。この再構成溶液には TAMRA-KaiB-His_6 分子の 3500 倍の濃度の野生型 KaiB タンパク質が含まれている計算となる。リン酸化 KaiC タンパク質量の振動変化は、上記の標準的な再構成溶液と基本的に同一であった（図 3C 黒丸）。この事から 1 nM で添加した TAMRA-KaiB-His_6 は Kai タンパク質振動体に干渉しないことが示唆された。

(b) 蛍光標識 KaiB タンパク質プローブと他の Kai タンパク質の相互作用

Kai タンパク質振動体再構成溶液における KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用を検出するために、384 ウェルプレートに対応した自動蛍光相関分光装置である一分子蛍光分析システム MF20（オリンパス社製）を使用した。最初に、TAMRA-KaiB-His_6 をプローブとして使用し、KaiB タンパク質と KaiC タンパク質の相互作用を検出することができるかどうかを検証した。1 nM の TAMRA-KaiB-His_6 と 3.5 μM の KaiB タンパク質を含む 30 μl のサンプル溶液を調製し、2 時間毎に 5 日間以上蛍光相関分光法による計測を行った。図 4A に示すように、プローブの平均的な並進拡散時間は 450 μs から 510 μs の値を示しほとんど変化がなかった。一方で、1 nM の TAMRA-KaiB-His_6 と 3.5 μM の KaiB タンパク質、3.5 μM の KaiC タンパク質からなるサンプル溶液中のプローブの平均的な並進拡散時間にはダイナミックな変化が見られた（図 4C）。

インキュベーション開始後の最初の計測時の並進拡散時間は 575.7 ± 11.6 μs であり、その値はプローブと KaiB タンパク質のみのサンプル溶液で計測された並進拡散時間よりも長かった。この事は TAMRA-KaiB-His_6 分子がインキュベーション開始後速やかに KaiC タンパク質に結合することを示唆している。並進拡散時間はインキュベーション開始から 7.5 時間後までは増加し続け、ピーク時には 753.5 ± 20.5 μs の値を示した。その後、24 時間後までは徐々に減少した。24 時間後からその後 4 日間は約 650 μs でほぼ一定値を示した。これらのデータは、KaiC タンパク質に結合する TAMRA-KaiB-His_6 プローブの割合はインキュベーション開始から 7.5 時間までは増加し続け、その後 16.5 時間をかけて減少して、更にその後はほぼ一定であることを示している。今回の蛍光相関分光法で得られた TAMRA-KaiB-His_6 プローブと KaiC タンパク質の時間経過に伴う結合状態変化のデータは先行研究における KaiB タンパク質と KaiC タンパク質間での免疫沈降法による実験結果と一致している（Kageyama *et al.*, 2006）。今回調製したプローブでは、KaiA タンパク質と KaiB タンパク質間の相互作用は検出できなかった（図 4B）。このように TAMRA-KaiB-His_6 プローブは、KaiB タンパク質と KaiC タンパク質の相互作用を蛍光相関分光法により経時観測するのに有用であることが分かった。

次に、Kai タンパク質振動体再構成溶液に TAMRA-KaiB-His_6 プローブを添加して、蛍光相関分光法による計測を行った。並進拡散時間は約 500 μs から約 900 μs の間を約 22 時間の周期で減衰することなく振動し、このプローブが概日周期で振動するタンパク質間相互作用に取り込まれていることが分かった（図 4D）。並進拡散時間のピークは、リン酸化 KaiC タンパク質量のピークから約 5 時間遅れていた（図 4E）。先行研究では、KaiB タンパク質は KaiB-KaiC タンパク質複合体もしくは KaiA-KaiB-KaiC タンパク質複合体の形で存在し、また

複合体量のピークはリン酸化KaiCタンパク質のピークから4-6時間遅れることが報告されている（Kageyama *et al.*, 2006）。この観測結果からプローブの並進拡散時間の振動は再構成溶液におけるKaiBタンパク質の変動を表していると予想された。

上記の予想を確認するために、プローブを添加した再構成溶液の並進拡散時間が最長となるデータポイント（インキュベーション開始から9.4時間後、図4D）を用いて、蛍光相関分光法の2成分解析を行った。2成分解析は、異なる並進拡散時間を持つ2種類の蛍光分子の解析に使用される。2種類の蛍光分子を区別するには、並進拡散時間は最低でも1.6倍の違いがあることが必要とされている（Meseth *et al.*, 1999）。Stokes-Einsteinの式によると、球状分子の並進拡散時間は分子量の3乗根に比例する。すなわち、2種類の蛍光分子は最低でも4.1倍の分子量の違いが必要であると考えられる。先行研究においては、再構成溶液をゲルろ過後にSDS-PAGE解析することで、KaiBタンパク質が約25 kDaの遊離型と約500 kDaの複合体内存在型の異なる様式で存在することが示された（Kageyama *et al.*, 2006）。この異なる様式間での約20倍の分子量の違いは、2成分解析を可能にすると考えられた。インキュベーション開始から9.4時間後のプローブとKaiBタンパク質のみが含まれる溶液中のプローブの並進拡散時間は、482.5 ± 16.6 μsであった。この値をτ_{free}として固定し、2成分解析を行ったところ、$\tau_{complex}$が1243.0 ± 256.9 μsでyが35.2 ± 13.8%と算出された（図5A）。複合体内存在型の存在比率は、64.8 ± 13.8%であった。2成分解析の妥当性は、複合体内存在型の並進拡散時間である1243.0 μsという値がStokes-Einsteinの式によって算出される約1309.7 μsという理論値と近いことから実証された。先行研究では、再構成溶液中において最大で約2/3のKaiBタンパク質が複合体内に存在することが示されている（Kageyama *et al.*, 2006）。

今回の蛍光相関分光法による計測結果と生化学的な実験の一致から、再構成溶液中の KaiB タンパク質プローブは KaiB タンパク質と同一の挙動を示し、周期的な複合体形成のリアルタイムモニタリングを可能にしていると結論付けることができた。

2 成分解析は再構成溶液中の全てのデータポイントについても実施した。KaiB タンパク質の複合体内存在型の比率は、τ_{free} と $\tau_{complex}$ の値を固定して算出した。インキュベーション時間の経過に伴う比率の振動は、平均的な並進拡散時間の振動と周期やピークとトラフの位相の点で似通っていた。比率はピーク時には約 60%で、トラフ時には約 10%を示した（図 5B）。

続いて、再構成溶液を蛍光相関分光法に用いるレーザー光に長時間曝露することで、光毒性もしくは蛍光退色などにより振動体の反応が阻害されないかを検証した。各データポイントにおける曝露時間（計測時間）は、15 秒を 10 回から 15 秒を 100 回まで変化させた。この条件では、最大で 92 時間の観測時間のうち、計 18 時間レーザー光に曝露されることになる。観測の結果、どの計測条件においても並進拡散時間の概日振動に違いはなかった（図 6）。この結果から、今回の観測系は比較的長時間のレーザー光曝露においても、正確に複合体形成をモニタリングできていることが分かった。

2）高温パルス刺激に対する Kai タンパク質振動体の応答

(a) 高温パルス刺激に対する位相応答

シアノバクテリアの試験管内の Kai タンパク質振動体は細胞内の概日振動と同様に温度変化に対して、同調することが知られている（Golden *et al.*, 1997;

Johnson *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2007; Rensing *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2009)。そこで私は今回開発した蛍光相関分光法による Kai タンパク質振動体再構成溶液のモニタリング法を用いて、温度刺激に対する KaiB タンパク質の相互作用の周期的な変動の位相応答が観測できるかどうかを調べた。短時間のパルス刺激に対する位相応答データはシステム解析の基本的なデータである。このようなデータを取得するための実験には、多くのサンプルと長時間に渡る実験から得られる多くのタイムポイントデータが要求される。また、位相変化の前後に跨る遷移状態の観測からはシステムのダイナミクスを解明するために有用な情報が得られるが、その取得には高い時間分解能を持つ観測手段が要求される。蛍光相関分光法は、これらの種類の実験に対して有用なツールであることが期待される。Kai タンパク質振動体再構成溶液に高温パルス刺激を与えて KaiB タンパク質の相互作用の変動を調べた。最初に、再構成溶液を異なる複数のチューブに分けて調製し、蛍光相関分光法による計測を開始した。各チューブに対して、インキュベーション開始から 12 時間後、16 時間後、20 時間後、24 時間後、28 時間後、32 時間後のいずれかのタイミングにおいて 50°C で 30 分間の高温刺激を与えた。高温刺激にも関わらず KaiB タンパク質の周期的な相互作用の変動の振幅には影響がなかった。このことは再構成溶液の内容物が今回の検討している範囲において、変性していないことを示す（図 7)。インキュベーション開始から 20 時間後もしくは 28 時間後に高温パルス刺激を与えたサンプルでは位相シフトが観測された（図 7C、E)。インキュベーション開始から 20 時間後に刺激を与えた再構成溶液では刺激を与えていないコントロールに比べて 2 時間の位相前進が見られた。一方で、インキュベーション開始から 28 時間後に刺激を加えた再構成溶液では刺激を与えていないコントロールに比べて 2 時間の位相後退が見られた。インキュベーション開始から 12 時間後、16 時間

後、24 時間後、32 時間後のいずれかのタイミングで刺激を与えた再構成溶液では位相変化は観測されなかった（図 7A、B、D、F)。図 8 にまとめた通り、調べたほとんどの時間帯では位相変化は観測されず限られたタイミングにおいてのみ位相変化が観測された事から、先行研究と同様に温度変化に対して Kai タンパク質振動体が同調することが示唆された。

(b) 位相変化の遷移状態の高時間分解能観測

高温パルス刺激による KaiB タンパク質の相互作用の位相変化が、刺激後にどのように遷移していくのかを蛍光相関分光法によるモニタリングで計測間隔を短くした条件に設定して観測した。インキュベーション開始から 20 時間後に再構成溶液に高温パルス刺激を与え、その直後の 7 時間は 10 分毎に、続く 13 時間は 30 分毎に、最後の 52 時間は 2 時間毎に、計 92 時間のインキュベーションの間、蛍光相関分光法による計測を行った。上述の 2 時間ごとの解析と同様に計測間隔を短くして行った解析においても、約 2 時間の位相前進が観測され（図 7C、図 9A)、並進拡散時間の変動の波形も似通っていた。高温パルス刺激を与えた再構成溶液の並進拡散時間は、刺激直後であるインキュベーション開始から 20.9 時間後から 23.8 時間後まで､刺激なしのコントロール溶液の並進拡散時間に比べて短い値を示した（図 9B)。刺激を与えた溶液ではインキュベーション開始から 26.6 時間後には並進拡散時間の明確な増加が観測されたのに対して、刺激なしのコントロール溶液ではインキュベーション開始から 28 時間後に増加し始めた。インキュベーション開始から 20 時間後の高温パルス刺激による位相シフトは、刺激直後に起こっていた。このように蛍光相関分光法によるリアルタイムモニタリング法では、Kai タンパク質振動体再構成溶液中の KaiB タンパク質の相互作用の変動を高い時間分解能で観測することができた。

3）アデニル酸の添加に対する Kai タンパク質振動体の応答

(a) 異なる ATP 濃度条件下における Kai タンパク質再構成溶液中の KaiB タンパク質相互作用の変動

シアノバクテリアの概日時計において、ATP/ADP 比の変化は明暗条件への同調において中心的な役割を担うことが提唱されている（Rust *et al.*, 2011）。そこで、ATP、ADP 濃度が変化するこの同調過程における KaiB タンパク質の相互作用の変動を観測するために、上記の蛍光 KaiB タンパク質プローブを用いた蛍光相関分光法によるモニタリング法を使用した。

最初に、KaiB タンパク質の周期的な相互作用変動に対する ATP 濃度の影響を調べるために、ATP の添加濃度を 1 mM、4 mM、8 mM、10 mM と変えた Kai タンパク質振動体再構成溶液を調製した。調製した溶液は速やかに一分子蛍光分析装置 MF20 にセットし、1 時間毎に 72 時間の間、蛍光相関分光法による計測を行った。上記の通り、再構成溶液中の蛍光 KaiB タンパク質プローブを蛍光相関分光法の 1 成分解析すると、算出された並進拡散時間は概日振動する。並進拡散時間の変動は KaiB タンパク質全体の内、KaiC タンパク質複合体と相互作用する KaiB タンパク質の結合率を反映している。図 10 は異なる ATP 濃度条件下における並進拡散時間の変動を示している。1 mM の ATP が含まれるサンプル溶液では、並進拡散時間は最初の 8 時間で 486.4 ± 9.5 μs から 726.9 ± 33 μs まで増加した（図 10A）。ピークを迎えた後、並進拡散時間はインキュベーション開始から 24 時間後まで徐々に減少し、続く 48 時間は約 570 μs でほぼ一定値を示した。この結果は、KaiC タンパク質複合体に含まれる KaiB タンパ

ク質の量は、最初の 8 時間で増加し、その後、減少して一定値に到達することを示している。対照的に 4 mM の ATP が含まれるサンプル溶液では、並進拡散時間は最初の 499.3 ± 12 μs からインキュベーション開始から 7.2 時間後のピーク値である 746.8 ± 19.7 μs まで増加した後、24 時間後までは減少するものの、その後再度増加し、概日振動を示した（図 10B)。8 mM の ATP が含まれるサンプル溶液でも並進拡散時間の概日振動は観測された（図 10C)。但し、振動の周期長は 4 mM のサンプル溶液に比べると短かった。10 mM の ATP が含まれるサンプル溶液では、最初の 6 時間で並進拡散時間が 531 ± 12.2 μs から 792.9 ± 20.7 μs まで増加した（図 10D)。その後、並進拡散時間は 14 時間後までは減少し、続く 58 時間は約 670 μs でほぼ一定値を示した。この非振動パターンは 1 mM の ATP が含まれるサンプル溶液で観測されるパターンに似ていた。しかし、1 mM の ATP が含まれるサンプル溶液に比べて、最初のピークは 2 時間早く、ピーク時と安定時における並進拡散時間は長かった。これらの結果から、ATP 濃度の増加は KaiB タンパク質の KaiC タンパク質複合体への相互作用を促進させることが示された。結果の 1)、2)では 1 mM の ATP 存在下において相互作用の振動が検出できたが、今回の実験では振動が検出できなかった。今回実験に用いた条件は Kai タンパク質のロット以外は同じ条件を採用しているので、調製した Kai タンパク質のロットごとに必要な ATP 濃度が異なる可能性が考えられる。KaiB タンパク質の相互作用の周期的な変動は 4 mM ATP もしくは 8 mM ATP の存在下で観測されたので、この後の実験ではこれらの ATP 濃度条件下で実験を行うことにした。

続いて、KaiB タンパク質の相互作用の周期的な変動に対する ADP 添加の影響を調べた（図 11)。ATP と ADP の濃度が異なる次の 3 種類の再構成溶液を調製した。3 種類の異なる ATP、ADP 濃度の溶液は、4 mM ATP を含む溶液、8 mM

ATP を含む溶液、4 mM ATP と 4 mM ADP を含む溶液である。4 mM ATP と 4 mM ADP を含む溶液では、KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の周期的な相互作用の変動が観測された。この溶液での振動のピーク間隔の平均は約 18 時間を示し、4 mM ATP での平均ピーク間隔（約 20.1 時間）と 8 mM ATP での平均ピーク間隔（約 13.8 時間）の中間であった。これらの結果から、再構成溶液に対する ADP の添加は周期長を短くする効果があることが分かった。但し、その効果は同量の ATP 添加時よりも小さかった。

(b) Kai タンパク質振動体の ADP 添加による位相シフト

先行研究では、Kai タンパク質振動体再構成溶液における ATP/ADP 比の変化はリン酸化 KaiC タンパク質の振動を時刻に依存して位相シフトさせることが示されている（Rust *et al.*, 2011）。私は再構成溶液の異なる時刻において ATP/ADP 比を減少させることが、KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用にどのような影響を与えるのか観測しようと考えた。まず、最初に 4 mM の ATP を含む再構成溶液を調製し、インキュベーションを開始した後の様々なタイミングで ADP を最終濃度が 4 mM になるように添加した。添加したタイミングは、インキュベーション開始から 12 時間後、16 時間後、20 時間後、24 時間後、28 時間後、32 時間後である（図 12 矢頭）。インキュベーション開始から 12 時間後から 32 時間後の範囲は、KaiB タンパク質の相互作用の振動の 1 サイクルに相当する。インキュベーション開始から 12 時間後のタイミングと 32 時間後のタイミングは、KaiB タンパク質の KaiC タンパク質複合体からの解離が進行する初期に相当する。インキュベーション開始から 16 時間後のタイミングは同様に解離が進行する後期に相当する。インキュベーション開始から 20 時間後のタイミングは KaiB タンパク質の KaiC タンパク質複合体との結合量が

最も少ない時期に相当する。インキュベーション開始から 24 時間後のタイミングと 28 時間後のタイミングは、それぞれ KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の結合が進む時期のそれぞれ初期と後期に相当する。

ADP の添加により、添加したタイミングにかかわらず最終的には KaiB タンパク質の相互作用の振動周期は短くなった（図 12)。一方で、短周期化するまでの遷移過程は添加するタイミングにより大きく異なっていた。インキュベーション開始から 12 時間後に ADP を添加した時には、22 時間後まではコントロール溶液と同様の変動パターンを示し、その後に短周期の振動へと変化した（図 12A)。インキュベーション開始から 16 時間後に ADP を添加した時には、添加の影響は 20 時間後前後に表れ始めた（図 12B)。インキュベーション開始から 20 時間後に ADP を添加した時には、並進拡散時間は直ぐに増加し、短周期の振動に移行しているように見えた（図 12C)。インキュベーション開始から 24 時間後に ADP を添加した時と 28 時間後に ADP を添加した時には、添加直後に並進拡散時間の増加が加速した（図 12D、E)。この事は KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用形成反応が ADP 添加の直後に加速したことを示している。インキュベーション開始から 32 時間後に ADP を添加した時には、コントロール溶液に比べて並進拡散時間の減少が約 1 時間遅れた（図 12F)。この事は KaiB タンパク質の KaiC タンパク質複合体からの解離反応が ADP 添加により抑制されたことを示している。これらの一連の結果は、ATP/ADP 比の変化が KaiB タンパク質の相互作用の振動周期を短周期化させるのと同時に時刻に依存した位相シフトが起きていることを示している。

(c) ADP 添加に応答した KaiB タンパク質の周期的な相互作用の変動に関するパラメータの数理解析

ATP/ADP 比の減少に応答した KaiB タンパク質の周期的な相互作用の変動を定量的に評価するために、数理解析を行った。各再構成溶液中の KaiB タンパク質プローブの並進拡散時間の時系列データを三角関数に適合させた（図 13A、表 2)。ADP を添加した再構成溶液では、ADP 添加後 12 時間目からインキュベーション開始後 72 時間までのデータを適合させ、コントロール溶液では、インキュベーション開始の 24 時間後から 72 時間後までのデータを適合させた。表 2 に各再構成溶液の適合結果を示した。重複して取ったコントロール溶液のデータでは、周期長は 19.6 時間と 19.9 時間を示した。一方で、ADP を添加した再構成溶液では 15.9 時間から 16.8 時間の間の周期長を示し、数理解析の結果からも短周期化していることが確認できる。次に ADP 添加後の位相シフト量を算出した。周期長の異なる振動子の位相を比較するために、“概日時間”（Circadian Time）の概念を導入した。ここでは、0 (= 24)時の“概日時間”と 12 時の“概日時間”は、各適合曲線のピークとトラフに相当する。ADP を添加した再構成溶液とコントロール溶液の両方で、ADP 添加時の時刻を“概日時間”に換算し、位相シフト量（ψ）を換算した位相の差として計算した（「実験材料と方法」を参照)。ADP 添加時の“概日時間”と位相シフト量をプロットしたのが、図 13B のグラフである。0 時の“概日時間”の前後において ADP を添加した場合には約 2 時間の位相後退が見られ、一方で 12 時の“概日時間”の前後において ADP を添加した場合には約 3 時間の位相前進が見られた。それ以外の“概日時間”において ADP を添加した再構成溶液では、位相シフト量は−2 時間から+3 時間の間の値を示した。0 時の“概日時間”の前後に位置する 2 つのデータポイントは、インキュベーション開始から 12 時間後と 32 時間後にあたり、どちらも KaiB タンパク質の KaiC タンパク質複合体からの解離が進行する初期である。これらのデータポイントの解析結果が同様の位相後退を示すことは、数理解析の有効性を支持して

いると考えられた。

サンプル溶液	周期(h)	振幅(μs)	ピーク時の位相(h)
コントロール溶液 A	19.6	68.0	−7.9
コントロール溶液 B	19.9	77.3	−9.0
12 時間目に ADP(A)	16.2	80.0	−3.0
16 時間目に ADP(A)	15.9	69.0	−3.9
20 時間目に ADP(A)	16.0	71.7	−4.7
24 時間目に ADP(B)	16.8	78.6	−3.7
28 時間目に ADP(B)	16.6	82.4	−1.7
32 時間目に ADP(B)	16.2	88.5	0.1

表 2　ADP 添加に応答した KaiB タンパク質の周期的な相互作用の変動に関するパラメータの数理解析

図 12 に示した並進拡散時間の時系列データを「実験材料と方法」に示した方法で三角関数に適合させた。ADP を添加した各再構成溶液に対するコントロール溶液（A もしくは B）はサンプル溶液名の右肩の括弧の中に示した。

考察

本研究では、シアノバクテリアの概日時計の中心に位置する Kai タンパク質振動体における Kai タンパク質間の相互作用の動態を解析した。Kai タンパク質振動体は試験管内において再構成可能であり、リン酸化 KaiC タンパク質比率の周期的な変化を基準に解析が進められてきた（Nakajima *et al.*, 2005; Nishiwaki *et al.*, 2007）。KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用は、KaiC タンパク質のリン酸化状態のスイッチングに関わり、その動態を解析することは振動体の特性を理解する上で必須である。試験管内におけるタンパク質間相互作用の解析は、細胞内の生理現象（細胞分裂、転写、翻訳、タンパク質の生理的分解）による量的変化や相互作用に影響を与える様々な細胞内因子の間接的な作用を切り離して分析できることから、興味のある反応に焦点を絞った直接的な解析が可能である。一方で、試験管内の相互作用が細胞内をどの程度まで反映しているかという点には注意する必要がある。細胞からの抽出物や組換えタンパク質が本来の機能を維持できているか？相互作用検出のためのタンパク質の修飾や物理的な刺激は相互作用を邪魔しないだろうか？これらの疑問を解決し制御システムを構築するタンパク質間相互作用を理解するためには、注目する相互作用のダイナミクスを生理的に意味のある形で再現し、検出操作が相互作用に与えてしまう影響を最小限に抑えた分析方法の確立が必要である。本研究において用いたリアルタイムモニタリング法は、試験管内に再構成された振動体が持つ本質的な特徴には影響を与えない非浸襲的なモニタリング法として制御システムの機能解明に重要なツールとなることが期待できる。以下に、本方法の持つ特徴とそれを可能にした技術の考察から始め、本法を「外部環境への同調」の過程において用いることで明らかになった Kai タンパク質間相互作用の機能についての考察を行う。

KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用のリアルタイムモニタリング法の優位性

本方法にはいくつかの利点がある。1 つ目は、再構成溶液内において変動する KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用の状態を単一のチューブを連続して自動計測することでモニタリングできるという点である（表 1)。従来の Kai タンパク質間相互作用の解析は、複数のサンプルチューブを準備するかもしくは単一のチューブからサンプリングを行い、ゲルろ過や電気泳動などの多段階のステップを踏むことで状態変化を検出していた。本方法を用いることで、煩雑になりがちな実験手順を回避することができ、精度の高い実験データを得ることができる。また、手作業での実験では実現の難しい高頻度な測定が可能になる。自動計測による省力化の効果は、例えば、細胞レベルの研究において近藤らが開発した発光遺伝子を用いた遺伝子発現の自動検出法が *kai* 遺伝子群の単離から機能解析の研究の流れで強力なツールとなったという例がある（Kondo *et al.*, 1993; Ishiura *et al.*, 1998; Tomita *et al.*, 2005)。また、筆者らは 2000 年代にゲノム研究の一連の流れの中においてモデル植物の網羅的な遺伝子の機能解析研究に携わり、自動計測を用いた実験手法を有効に活用した（参考文献 Ichikawa *et al.*, 2003; 参考文献 Yamamoto *et al.*, 2003)。これらの例からも分かる通り、相互作用を自動検出できる本モニタリング法は、今後の Kai タンパク質間相互作用の機能解明を力強く推進することが期待できる。2 つ目は、蛍光標識 KaiB タンパク質プローブの添加とレーザーの繰り返し照射にも関わらず、Kai タンパク質振動体再構成溶液が通常と変わらずに振動反応を維持しているという点である（図 3C、図 6)。この特徴により、タンパク質間相互

作用の変動を単一のチューブで幅広い時間幅において検出することが可能になった。本研究では高温パルス刺激を与えた再構成溶液に対して、全体として約 5 日間の相互作用の振動変化を観測すると同時に刺激直後の位相応答変化の遷移過程を 10 分ごとのインターバルで計測した（図 9)。3 つ目は、相互作用の変化を定量的に解析することが可能であるという点である。本研究では蛍光相関分光法の 2 成分解析を用いることで再構成溶液中における KaiB タンパク質の内、KaiC タンパク質複合体と相互作用している比率を算出することに成功している（図 5B)。結合している割合はピーク時に約 60%と算出され、先行研究でのゲルろ過解析においてピーク時が約 2/3 量と算出された値とほぼ同様の値が算出されていることから計算の妥当性が確認できた。1 成分解析で得られた平均的な並進拡散時間の変動からは、相互作用の振動変化の周期や位相の計算も可能である。並進拡散時間の時系列データに対して数理解析を行うことで、ATP/ADP 比の減少に応答した KaiB タンパク質の周期的な相互作用の変動を定量的に評価することができた（表 2)。

本モニタリング法が上記の特徴を示す上で、共焦点光学系による蛍光相関分光法と蛍光標識 KaiB タンパク質プローブ作成のための部位特異的蛍光標識技術が重要な役割を果たしたと考えられる。蛍光相関分光法の共焦点光学系において用いられる励起レーザー光は溶液中の微小な領域（約 1fl のコンフォーカルボリューム）にフォーカスされる（図 2A)。蛍光技術を用いた細胞観察や溶液計測時には、励起レーザー光の繰返し照射が蛍光褪色や細胞（分子）へのダメージを引き起こすという現象が問題視されている。一方で、本方法においては高頻度の光照射にも関わらず、蛍光標識 KaiB タンパク質プローブや Kai タンパク質振動体全体へのダメージは見られなかった（図 6)。再構成溶液中の分子はブラウン運動により”微小な領域”の内部に留まり続けることなく、出入りして

いると予想される（図 2B)。励起レーザー光は検出される分子に照射され続けることがないため、再構成溶液中の分子へのダメージを低減できていると予想できる。蛍光相関分光法は、溶液中の検出領域が微小である事に加えて、計測する溶液の蛍光分子濃度が非常に低い事も特徴の 1 つである。本方法では約 1 nM の蛍光標識 KaiB タンパク質プローブ（TAMRA-KaiB-His_6）を再構成溶液に添加して、計測を行った。先行研究においては、シアノバクテリア内の Kai タンパク質をタグつき Kai タンパク質（*kaiA-flag*; *kaiB -His*$_6$）に置き換えたところ、概日リズム自体は見られるものの周期長に変化が見られている（Kageyama *et al.*, 2006)。本研究では、蛍光標識 KaiB タンパク質プローブを非修飾 Kai タンパク質からなる再構成溶液に添加したので、概日リズムの周期に悪影響を及ぼす恐れがあった。しかしながら、プローブを添加した溶液と添加していない溶液では、リン酸化 KaiC タンパク質量の概日リズムの周期やその他の特徴に大きな違いは見られなかった（図 3C)。再構成溶液に含まれるタグなしの Kai タンパク質とタグ付きの Kai タンパク質には、濃度比で 3500 倍の違いがある。蛍光標識 KaiB タンパク質プローブの濃度が相対的に低かったことが概日リズムの周期への悪影響を回避できた理由であると推測された。このような蛍光相関分光法の特徴は、今回検討した Kai タンパク質再構成溶液以外の同程度の濃度で構成される反応系においても適用可能であり、反応系内の生体分子の特徴を非浸襲的で高精度に解析することが期待できる。

蛍光標識 KaiB タンパク質プローブ作成のために用いた部位特異的蛍光標識技術は、相互作用解析の定量性の向上に大きく役立った。本標識技術は、無細胞タンパク質合成系と 4 塩基の人工コドンにより目的のタンパク質に TAMRA-X-aminophenylalanine 残基を導入する（図 3A)。蛍光標識時に付加されるアミノ酸配列は分子量が約 4 kDa であるため、元の KaiB タンパク質から

の分子量の増加を低く抑えることができる。タンパク質の蛍光標識法としては、GFP などの蛍光タンパク質を用いる方法なども幅広く使用されている。しかしながら、蛍光タンパク質の付加による元の相互作用への悪影響が報告されていることに加え（Schmid *et al.*, 2005）、分子量が大きいことから（GFP は単量体で約 28 kDa）、分子サイズの変化により相互作用を検出する蛍光相関分光法の検出精度を低下させる可能性がある。また、タンパク質のアミノ酸の側鎖に存在するアミノ基やチオール基を狙って蛍光色素を結合させる化学標識法を頻繁に使用されている。しかしながら、この方法ではカップリング反応が起こるアミノ酸の位置や数が不均一になるため、タンパク質間相互作用の定量解析の妨げになる可能性が考えられた。以上の理由から今回採用した部位特異的蛍光標識技術は、蛍光相関分光法による相互作用データの定量性の向上に大きく役割を果たしたと考えられた。

Kai タンパク質振動体の同調過程における Kai タンパク質間相互作用の動態観測

このような特徴を持つ非浸襲的モニタリング法を用いて、Kai タンパク質振動体の同調過程における Kai タンパク質間相互作用の挙動を観測した。シアノバクテリアの概日時計は温度環境や光環境の変化に対して同調することが知られている（Golden *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 2002）。また、試験管内に再構成された Kai タンパク質振動体も同様に温度変化によって同調することが報告されている（Mori *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009）。概日時計の同調現象の多くはノンパラメトリックな同調モデルで説明されており、このモデルでは概日時計の時刻に依存した位相変化を位相応答曲線の形で表現して解析する（Johnson

et al., 2004)。Kai タンパク質振動体に対して高温パルス刺激を与えると周期的な相互作用変動が時刻依存的な位相変化を示したことから、ノンパラメトリックな同調モデルでの考察を試みた（図 7、図 8)。高温パルス刺激による位相応答は、吉田らの先行研究においてリン酸化 KaiC タンパク質の比率を指標として作成された位相応答曲線が報告されていた（Yoshida *et al.*, 2009)。本研究で観測した KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用のピークは、リン酸化 KaiC タンパク質の比率のピークから約 1/4 周期遅れることが確かめられている（図 4E)。吉田らの結果と本研究での高温パルス実験の結果を概日時間(Circadian Time)で規格化し、吉田らが作成した CT16 を KaiC タンパク質の比率のピーク時とする位相応答曲線に重ね合わせて比較した（図 14A)。ノンパラメトリックな同調モデルでは、暗黒下で育てた昼行性生物に対して光パルス処理した時の位相応答曲線が代表的な例として報告されている（Johnson *et al.*, 2004)。暗黒下において生物が主観的に夜の終わりから朝と感じている時間帯に与えた光パルスは位相を前進させ、夕方から夜の始まりの光パルスでは位相を後退させ、昼と感じている時間帯では位相変化が少ないのが一般的である。その結果、光パルスは概日時計の位相を昼の時間帯に変化させることになる。本研究と吉田らの結果は、いずれも主観的な昼の時間帯である CT7-10 付近を境にして位相前進と位相後退が入れ替わっていたことから、Kai タンパク質振動体において高温パルス刺激は CT7-10 の時間帯に周りの振動体の位相を集中させていた（図 14B)。シアノバクテリアは高温刺激が昼の時間帯になるように同調することが報告されている（Lin *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2009)。主観的な昼の時刻前後においては Kai タンパク質振動体再構成溶液内と細胞内で同様の現象が起きることを示唆していた。また、CT7-10 の時間帯は KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用が最も少なくなる時間帯であり且つ KaiC タ

ンパク質の自己リン酸化活性が最も高くなる時間帯とも一致する（図 1、図 14B）。高温パルスにより KaiB タンパク質の解離を伴う KaiC タンパク質の立体構造変化が急速に引き起こされ、KaiC タンパク質の酵素活性に影響を与えているかもしれない。実際に、本モニタリング法では高温パルス刺激後の KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用を高い時間分解能で観測したところ、刺激の直後に KaiB タンパク質の解離が進行している様子が確認できた（図 9）。では、刺激直後の KaiC タンパク質の立体構造変化や自己リン酸化活性または ATPase 活性はどのように変化しているのだろうか？吉田らの先行研究では KaiC タンパク質のリン酸化状態は高温パルス刺激後からしばらく時間を経て位相応答している様子が観測されている。そのことから高温パルス刺激後の遷移過程においては、KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用の状態とリン酸化 KaiC タンパク質比率が同期していないと考えられる。遷移過程において各制御要素の状態を同時に検出することで Kai タンパク質振動体のどの制御要素が外部環境の変化を検知し、その情報がどのように伝播し、振動体全体が同期していくのかを明らかにすることができるかもしれない（表 1）。

本研究で作成した高温パルス刺激による位相応答曲線は吉田らが作成した位相応答曲線とは異なる点も存在した。吉田らの高温パルス刺激は振動周期のほとんどのタイミングで位相変化を引き起こしたが、本研究での高温パルス刺激はほとんどのタイミングで位相変化は観測されなかった（図 7、図 8、図 14A; Yoshida *et al.*, 2009）。両者の検討では高温パルスの条件が異なる。吉田らが用いた条件が 45°C で 4 時間であるのに対して、本研究では 50°C で 30 分間の条件を採用した。マウスを用いた先行研究では、位相応答曲線を用いた解析においてパルス刺激を与える時間幅を長くとることにより、位相応答の少ない時間帯が位相応答の多い時間帯と重なってしまい、結果として位相応答の少ない時

間帯が短くなるという仮説がある（Comas *et al.*, 2006）。本研究では短いパルス時間を実験条件に採用したことにより位相応答の少ない時間帯と位相応答の多い時間帯の区別が従来よりも明確になっているのかもしれない。高温パルス刺激による同調現象の観測では、本モニタリング法の持つ高い時間分解能という特徴を利用して刺激直後の速やかな相互作用の変動が明らかになった。また、短いパルス刺激の条件により高温パルス刺激に影響の出る位相が KaiC タンパク質の自己リン酸化活性のピークの前後に位置することを明確にした。

光環境の変化はシアノバクテリアにおいてアデニル酸の濃度変化を引き起こし、ATP/ADP 比率の変化は Kai タンパク質振動体を同調させることが示されている（Rust *et al.*, 2011）。本研究では、ATP や ADP の濃度を変化させた時の KaiB タンパク質と KaiC タンパク質複合体の相互作用の動態を観測した。ATP は KaiC タンパク質と結合し、KaiC タンパク質の触媒する ATPase 反応や自己リン酸化反応の基質である。再構成溶液中の ATP 濃度を増加させると、KaiB タンパク質の KaiC タンパク質複合体への結合が促進され、周期的な相互作用変動の周期長を短くした（図 10）。一方、再構成溶液の調製時に ADP の添加濃度を増加させても、周期的な相互作用変化の周期長は短くなった（図 11）。先行研究では ADP は KaiC タンパク質の自己リン酸化反応における競合阻害能を持つことが示されていた。自己リン酸化における ATP と ADP の相反する効果を考えると、ATP と ADP のどちらの濃度を増やしても周期が短くなるというのは驚くべき結果である。最近、ADP も ATP と同様に KaiC タンパク質に結合することや ADP が KaiC タンパク質の自己脱リン酸化反応において基質として働き ATP が合成されることが示された（Egli *et al.*, 2012; Nishiwaki *et al.*, 2012; Nishiwaki-Ohkawa *et al.*, 2014）。再構成溶液中に添加した高濃度の ADP はこれらの反応に関わることで Kai タンパク質振動体の短周期化を引き起こしてい

るのかもしれない。アデニル酸の添加により周期長を短くさせる効果に関しては、ATP の方が ADP よりも効力が大きかった（図 11）。このことは先行研究において ATP/ADP の比率が大きくなると、リン酸化 KaiC タンパク質の振動周期が短くなることと一致していた（Rust *et al.*, 2011）。

Kai タンパク質振動体再構成溶液の様々な時刻で ADP を添加すると、添加したタイミングによって添加直後の挙動に違いが観測された（図 12）。添加からしばらく経った後の相互作用の周期的変動は、ADP を添加したタイミングによらずどの溶液でも短周期化していた。ADP の存在下で短周期化する現象は、インキュベーションの途中から添加した場合と最初の溶液調製時のどちらにおいても観測されており、開始点に依存しない安定した振動現象であると考えられる（図 11、図 12、表 2）。Rust らの先行研究では、ATP/ADP 比率の一過的な減少によって Kai タンパク質振動体再構成溶液が時刻依存的に位相応答することが報告されている。本研究において ATP/ADP 比率を減少させた実験の数理解析で得られた位相変化量は、Rust らの示した位相変化量に比べると、相対的に小さかった。一方で、冨田らの先行研究においては、昼間の時間帯の終わりにシアノバクテリアを連続暗条件下に移してもリン酸化 KaiC タンパク質の比率の振動に対して位相変化はほとんど観測されなかった。暗条件下において、細胞内の ATP 濃度は減少することから冨田らの観測事例は Kai タンパク質振動体を用いた本研究と関連のある現象を観測している可能性がある。ADP 添加による位相応答は、高温パルス刺激による位相応答とは異なり、同調後に周期長の変化を伴っていた。また、遷移過程において ADP を添加していないコントロール溶液との違いが明確になる時間帯も ADP を添加するタイミングによって様々であった。そのため、遷移過程における Kai タンパク質振動体の時刻を正確に判定することは難しいと考えられる。連続暗条件下の細胞内 Kai タンパク質振

動体の挙動やそれを再現する ADP 添加の実験については、KaiC タンパク質の酵素活性や状態変化の実験も含めた更に詳細な解析が求められる。

今後の展望

概日時計は、生物が刻々と変化し続ける外部環境を予測し、適応するための制御システムである。単細胞性のシアノバクテリアにおいて概日時計は外部の環境変化によりもたらされるシグナルに同調し、様々な生理応答を引き起こす。本研究では、概日時計の中心に位置する Kai タンパク質振動体における Kai タンパク質間の相互作用を非侵襲モニタリングする方法を開発し、振動体の同調過程を観測した。独立栄養性の生物であるシアノバクテリアにとって、光環境の変化は概日時計の重要な同調因子である。最近、アデニル酸の濃度変化だけではなく、プラストキノンの酸化還元状態も光環境の変化を Kai タンパク質振動体に伝えるシグナル伝達因子であることが示された（Ivlena *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2012）。アデニル酸の濃度とプラストキノンの酸化還元状態は異なる時間スケールで光環境の変化に応答し、異なる入力信号として働くと考えられている。また、Kai タンパク質複合体に相互作用する SasA や CikA などのようなヒスチヂンキナーゼも光に応答した細胞内の概日リズムに影響を与えることが知られている（Iwasaki *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2012; Takai *et al.*, 2006）。本モニタリング法は単一のチューブ内において幅広い時間スケールで起きる Kai タンパク質の相互作用を検出し、概日リズムの特徴を理解することが可能である。細胞内で働く様々な因子による概日時計の同調現象を試験管内で再現し、異なる時間スケールで起こる現象を解析することで Kai タンパク質間相互作用の機能が解明されることが期待できる（図 15）。

概日時計の分子機構の解明に *kai* 変異体が果たした役割は極めて大きい。こ

れまでに概日リズムに異常を示す数多くの *kai* 変異体が報告されているが、分子レベルでの正確な特徴づけは未だに不十分である（Kondo *et al.*, 1994; Ishiura *et al.*, 1998）。本モニタリング法が持つ別の特徴として、比較的多くのサンプルに対して自動検出することが可能だという点がある。その特徴を利用して様々な変異型 Kai タンパク質の組み合わせにより再構成した振動体中の Kai タンパク質間相互作用を解析し、Kai タンパク質の機能を詳細に理解することも期待できる。

本モニタリング法は Kai タンパク質振動体が持つ本質的な特徴に影響を与えない非浸襲的なモニタリング法である。この利点を活かして、Kai タンパク質の下流で働く出力因子を KaiB タンパク質とは別の蛍光色で標識した同時モニタリング法の開発も可能である（図 15）。Kai タンパク質は自身の転写制御だけでなく、ゲノム上に存在する多くのプロモーターの活性を制御することが知られている（Liu *et al.*, 1995; Nakahira *et al.*, 2004）。SasA や RpaA、RpaB、LabA（Hanaoka *et al.*, 2012; Takai *et al.*, 2006; Taniguchi *et al.*, 2007）などの因子は Kai タンパク質から時間情報を受け取り、時刻に依存して遺伝子発現を制御すると考えられる。これらの出力因子を同時にモニタリングすることで概日時計の中心的振動体の状態と出力因子による時間情報の発信という両者のダイナミックな挙動を様々な実験条件下で同時追跡できる。

本研究では精製された 3 つの Kai タンパク質と ATP からなる再構成系を中心に解析を行ってきた。しかしながら、一般的には精製タンパク質のみからなる制御システムを、細胞内の機能を維持したまま試験管内に再構成することは難しい。精製タンパク質に替わる方法としては細胞の粗抽出液を使用する方法がある。近年、蛍光相関分光法では細胞抽出液を用いて細胞内反応を評価する方法も行われている（Stoevesandt *et al.*, 2005）。概日時計に関連する制御要素を

生体から取り出し、その機能解析に本モニタリング法を適用することで細胞内における概日時計の包括的な理解が進むと期待できる。

参考文献

Abe, T., Goda, K., Futami, K., and Furuichi, Y. (2009) Detection of siRNA administered to cells and animals by using a fluorescence intensity distribution analysis polarization system. *Nucleic Acids Res.* **37**, e56

Hagiwara, S., Goda, K., Matsuo, I., and Ito, Y. (2007) Analysis of ER-associated glycoprotein degradation using synthetic glycopeptide probes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 327–354

Hardtke, C. S., Gohda, K., Osterlund, M. T., Oyama, T., Okada, K., and Deng, X. W. (2000) HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J.* **19**, 4997-5006

Ichikawa, T., Nakazawa, M., Kawashima, M., Muto, S., Gohda, K., Suzuki, K., Ishikawa, A., Kobayashi, H., Yoshizumi, T., Tsumoto, Y., Iizumi, H., Goto, Y., and Matsui, M. (2003) Sequence database of 1172 T-DNA insertion sites in *Arabidopsis* activation-tagging lines that showed phenotypes in T1 generation. *Plant J.* **36**, 421–429

Yamamoto, Y. Y., Tsuhara, Y., Gohda, K., Suzuki, K., and Matsui, M. (2003) Gene trapping of the *Arabidopsis* genome with a firefly luciferase reporter. *Plant J.* **35**, 273–283

引用文献

Abe, R., Shiraga, K., Ebisu, S., Takagi, H., and Hohsaka, T. (2010) Incorporation of fluorescent non-natural amino acids into N-terminal tag of proteins in cell-free translation and its dependence on position and neighboring codons. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 32-38

Akiyama, S., Nohara, A., Ito, K., and Maeda, Y. (2008) Assembly and disassembly dynamics of the cyanobacterial periodsome. *Mol. Cell* **29**, 703-716

Bannai, M., Higuchi, K., Akesaka, T., Furukawa, M., Yamaoka, M., Sato, K., and Tokunaga, K. (2004) Single-nucleotide-polymorphism genotyping for whole-genome-amplified samples using automated fluorescence correlation spectroscopy. *Anal. Biochem.* **327**, 215-221

Chowdhury, P. K. (2011) Fluorescence correlation spectroscopy: A brief review of techniques and applications to biomolecules and biosystems. *J. Proteins Proteomics* **2**, 145-169

Comas, M., Beersma, D. G. M., Spoelstra, K., and Daan, S. (2006) Phase and period responses of the circadian system of mice (*Mus Musculus*) to light stimuli of different duration. *J. Biol. Rhythms.* **21**, 362–372

Egli, M., Mori, T., Pattanayek, R., Xu, Y., Qin, X., and Johnson, C. H. (2012)

Dephosphorylation of the core clock protein KaiC in the cyanobacterial KaiABC circadian oscillator proceeds via an ATP synthase mechanism. *Biochemistry* **51**, 1547-1558

Golden, S. S., Ishiura, M., Johnson, C. H., and Kondo, T. (1997) Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 327–354

Grobbelaar, N., Huang, T. C., Lin, H. Y., and Chow T. J. (1986) Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **37**, 173–177

Hanaoka, M., Takai, N., Hosokawa, N., Fujiwara, M., Akimoto, Y., Kobori, N., Iwasaki, H., Kondo, T., and Tanaka, K. (2012) RpaB, another response regulator operating circadian clock-dependent transcriptional regulation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Biol. Chem.* **287**, 26321–26327

Hayashi, F., Suzuki, H., Iwase, R., Uzumaki, T., Miyake, A., Shen, J. R., Imada, K., Furukawa, Y., Yonekura, K., Namba, K., and Ishiura, M. (2003) ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Cells* **8**, 287-296

Hitomi, K., Oyama, T., Han, S., Arvai, A. S., and Getzoff, E. D. (2005) Tetrameric architecture of the circadian clock protein KaiB: A novel

interface for intermolecular interactions and its impact on the circadian rhythm. *J. Biol. Chem.* **280**, 19127–19135

Hohsaka, T., and Sisido, M. (2002) Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 809-815

Hori, K., Shin, W. S., Hemmi, C., Toyo-oka, T., and Makino, T. (2003) High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **4**, 477-484

Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C. R., Tanabe, A., Golden, S. S., Johnson, C. H., and Kondo, T. (1998) Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**, 1519-1523

Ito, H., Kageyama, H., Mutsuda, M., Nakajima, M., Oyama, T., and Kondo, T. (2007) Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1084-1088

Ivleva, N. B., Gao, T., LiWang, A. C., and Golden, S. S. (2006) Quinone sensing by the circadian input kinase of the cyanobacterial circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 17468-17473

Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M., and Kondo, T.

(2002) KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 15788-15793

Iwasaki, H., Williams, S. B., Kitayama, Y., Ishiura, M., Golden, S. S., and Kondo, T. (2000) A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell* **101**, 223-233

Iwase, R., Imada, K., Hayashi, F., Uzumaki, T., Morishita, M., Onai, K., Furukawa, Y., Namba, K., and Ishiura, M. (2005) Functionally important substructures of circadian clock protein KaiB in a unique tetramer complex. *J. Biol. Chem.* **280**, 43141–43149

Johnson, C. H., Elliott, J., Foster, R., Honma, K., and Kronauer, R. (2004) Fundamental properties of circadian rhythms. in *Biological Timekeeping* (Dunlap, J. C., Loros, J. J., and DeCoursey, P. J., eds) pp. 67-105, Sinauer Associates, Sunderland, MA

Johnson, C. H., Stewart, P. L., and Egli, M. (2011) The cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 143-167

Kageyama, H., Kondo, T., and Iwasaki, H. (2003) Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC and SasA in cyanobacteria. *J.*

Biol. Chem. **278**, 2388–2395

Kageyama, H., Nishiwaki, T., Nakajima, M., Iwasaki, H., Oyama, T., and Kondo, T. (2006) Cyanobacterial circadian pacemaker. Kai protein complex dynamics in the KaiC phosphorylation cycle *in vitro*. *Mol. Cell* **23**, 161-171

Kato, H., Watanabe, S., Nimura-Matsune, K., Chibazakura, T., Tozawa, Y., and Yoshikawa, H. (2012) Exploration of a possible partnership among orphan two-component system proteins in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1484-1491

Kim, Y. I., Vinyard, D. J., Ananyev, G. M., Didmukes, G. C., and Golden S. S. (2012) Oxidized quinones signal onset of darkness directly to the cyanobacterial circadian oscillator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **109**, 17765-17769

Kitayama, Y., Iwasaki, H., Nishiwaki, T., and Kondo, T. (2003) KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J.* **22**, 2127-2134

Kobayashi, T., Kodani, Y., Nozawa, A., Endo, Y., and Sawasaki, T. (2008) DNA-binding profiling of human hormone nuclear receptors via fluorescence correlation spectroscopy in a cell-free system. *FEBS Lett.* **582**, 2737-2744

Kondo, T., Tsinoremas, N. F., Golden, S. S., Johnson, C. H., Kutsuna, S., and Ishiura, M. (1994) Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science* **266**, 1233-1236

Kondo, T., Strayer, C. A., Kulkarni, R. D., Taylor, W., Ishiura, M., Golden, S. S., and Johnson, C. H. (1993) Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 5672-5676

Krichevsky, O., and Bonnet, G. (2002) Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.* **65**, 251-297

Krouglova, T., Vercammen, J., and Engelborghs, Y. (2004) Correct diffusion coefficients of proteins in fluorescence correlation spectroscopy. Application to tubulin oligomers induced by Mg^{2+} and paclitaxel. *Biophys. J.* **87**, 2635-2646

Lin, R. F., Chou, H. M., and Huang, T. C. (1999) Priority of light/dark entrainment over temperature in setting the circadian rhythms of the prokaryote *Synechococcus* RF-1. *Planta* **209**, 202-206

Liu, Y., Tsinoremas, N. F., Johnson, C. H., Lebedeva, N. V., Golden, S. S., Ishiura, M., and Kondo, T. (1995) Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev* **9**, 1469-1478

Meseth, U., Wohland, T., Rigler, R., and Vogel, H. (1999) Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys. J.* **76**, 1619-1631

Millar, A. J., Short, S. R., Chua, N. -H., and Kay, S. A. (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* **4**, 1075-1087

Mitsui, A., Kumazawa, S, Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S., and Arai, T. (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* **323**, 720-722

Mori, T., Saveliev, S. V., Xu, Y., Stafford, W. F., Cox, M. M., Inman, R. B., and Johnson, C. H. (2002) Circadian clock protein KaiC forms ATP-dependent hexameric rings and binds DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 17203-17208

Mori, T., Williams, D. R., Byrne, M. O., Qin, X., Egli, M., Mchaourab, H. S., Stewart, P. L., and Johnson, C. H. (2007) Elucidating the ticking of an *in vitro* circadian clockwork. *PLoS Biol.* **5**, e93

Murayama, Y., Mukaiyama, A., Imai, K., Onoue, Y., Tsunoda, A., Nohara, A., Ishida, T., Maeda, Y., Terauchi, K., Kondo, T., and Akiyama, S. (2011) Tracking and visualizing the circadian ticking of the cyanobacterial clock

protein KaiC in solution. *EMBO J.* **30**, 68-78

Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, T., and Kondo, T. (2004) Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 881-885

Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., and Kondo, T. (2005) Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*. *Science* **308**, 414-415

Nakata, H., Ohtsuki, T., and Sisido, M. (2009) A protease inhibitor discovery method using fluorescence correlation spectroscopy with position-specific labeled protein substrates. *Anal. Biochem.* **390**, 121-125

Nishiwaki, T., Iwasaki, H., Ishiura, M., and Kondo, T. (2000) Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 495-499

Nishiwaki, T., Satomi, Y., Nakajima, M., Lee, C., Kiyohara, R., Kageyama, H., Kitayama, Y., Teramoto, M., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Go, M., Iwasaki, H., Takao, T., and Kondo, T. (2004) Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 13927-13932

Nishiwaki, T., Satomi, Y., Kitayama, Y., Terauchi, K., Kiyohara, R., Takao, T., and Kondo, T. (2007) A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J.* **26**, 4029-4037

Nishiwaki, T., and Kondo, T. (2012) Circadian autodephosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC occurs via formation of ATP as intermediate. *J. Biol. Chem.* **287**, 18030–18035

Nishiwaki-Ohkawa, T., Kitayama, Y., Ochiai, E., and Kondo, T. (2014) Exchange of ADP with ATP in the CII ATPase domain promotes autophosphorylation of cyanobacterial clock protein KaiC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **111**, 4455-4460

Panda, S., Hogenesch, J. B., and Kay, S. A. (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329-335

Piehler, J. (2005) New methodologies for measuring protein interactions *in vivo* and *in vitro*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 4-14

Rensing, L., and Ruoff, P. (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol. Int.* **19**, 807-864

Rust, M. J., Golden, S. S., and O'Shea, E. K. (2011) Light-driven changes in energy metabolism directly entrain the cyanobacterial circadian oscillator. *Science* **331**, 220–223

Schmid, J.A., and Neumeier, H. (2005) Evolutions in science triggered by green fluorescent protein (GFP). *Chembiochem* **6**, 1149-1156

Spoelstra, K., Albrecht, U., van der Horst, G. T., Brauer, V., and Daan, S. (2004) Phase responses to light pulses in mice lacking functional *per* or *cry* genes. *J. Biol. Rhythms.* **19**, 518–529

Stoevesandt, O., Köhler, K., Fischer, R., Johnson, I. C., and Brock, R. (2005) One-step analysis of protein complexes in microliters of cell lysate. *Nat. Methods* **2**, 833-835

Takai, N., Nakajima, M., Oyama, T., Kito, R., Sugita, C., Sugita, M., Kondo, T., and Iwasaki, H. (2006) A KaiC-associating SasA–RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 12109-12114

Taniguchi, Y., Katayama, M., Ito, R., Takai, N., Kondo, T., and Oyama, T. (2007) *labA*: a novel gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Dev* **21**, 60-70

Terauchi, K., Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Miwa, K., Murayama, Y., Oyama, T., and Kondo, T. (2007) ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 16377-16381

Tomita, J., Nakajima, M., Kondo, T., and Iwasaki, H. (2005) No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* **307**, 251–254

Xu, Y., Mori, T., and Johnson, C. H. (2000) Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting. *EMBO J.* **19**, 3349-3357

Xu, Y., Mori, T., and Johnson, C. H. (2003) Cyanobacterial circadian clockwork: roles of KaiA, KaiB and the *kaiBC* promoter in regulating KaiC. *EMBO J.* **22**, 2117-2126

Yan, Y., and Marriott, G. (2003) Analysis of protein interactions using fluorescence technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 635-640

Ye, S., Vakonakis, I., Ioerger, T. R., LiWang, A. C., and Sacchettini, J. C. (2004) Crystal structure of circadian clock protein KaiA from *Synechococcus elongatus*. *J. Biol. Chem.* **279**, 20511–20518

Yoshida, T., Murayama, Y., Ito, H., Kageyama, H., and Kondo, T. (2009) Nonparametric entrainment of the *in vitro* circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial KaiC by temperature cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 1648-1653

Watabe, S., Sakamoto, Y., Morikawa, M., Okada, R., Miura, T., and Ito, E. (2011) Highly sensitive determination of hydrogen peroxide and glucose by fluorescence correlation spectroscopy. *PLoS ONE*. **6**, e22955

謝辞

本研究を行うにあたり、京都大学大学院理学研究科植物学教室准教授小山時隆博士には終始ご指導と激励を頂きました。小山博士には 18 年前の京都大学理学部在籍時に分子生物学実験の手順をご指導頂いたことから始まり、長年にわたり公私共々ご助言とサポートを頂きました。心より御礼を申し上げます。

本研究は、オリンパス株式会社と名古屋大学大学院理学研究科近藤研究室の共同研究から始まりました。名古屋大学大学院理学研究科教授近藤孝男博士は貴重な研究の機会を与えて下さり、また折に触れ適切なご助言を与えて下さいました。厚く御礼を申し上げます。名古屋大学大学院理学研究科近藤研究室伊藤浩史博士には未発表のデータを提供して頂きました。西脇（大川）妙子博士、北山陽子博士には Kai タンパク質を分与して頂きました。深く感謝致します。

オリンパス株式会社長野隆氏、岡本直明博士、小林佐代子氏、後藤俊博氏、小島清嗣博士、唐木幸子博士、高橋威夫博士、鈴木浩文博士には研究の機会を与えて頂くとともに、実験遂行のためのご配慮を頂きました。深く感謝致します。オリンパス株式会社中田秀孝博士には蛍光標識法の技術について、山口光城氏、荻原真也氏には蛍光相関分光法の解析についてご助言とご協力を頂きました。深く感謝致します。

本研究を進める上で、京都大学大学院理学研究科の修士課程及び理化学研究所ゲノム科学総合研究センターにおける研究経験は大きな力になりました。それぞれに在籍していた時に、京都大学大学院理学研究科教授岡田清孝博士、石黒澄衛博士、槻木竜二博士、田中歩博士、理化学研究所松井南博士、山本義治博士、市川尚斉博士（全て所属当時）にご指導頂きました。深く感謝致します。

ここに全ての方の名前を挙げることはできませんが、京都大学大学院理学研究科植物学教室岡田研究室（1996-1999）、理化学研究所ゲノム科学総合研究センター植物ゲノム機能情報研究グループ（2000-2002）、名古屋大学大学院理学研究科近藤研究室、オリンパス株式会社、京都大学大学院大学院理学研究科植物学教室形態統御学研究室の関係者の皆様には多方面にわたり、多大なサポートと励ましを頂きました。深く感謝致します。

本学位論文は *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 誌と *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 誌に掲載された2編の学術論文の内容に基づき書かれたものである。

This research was originally published in *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Kazuhito Goda, Hiroshi Ito, Takao Kondo, and Tokitaka Oyama. Fluorescence correlation spectroscopy to monitor Kai protein-based circadian oscillations in real time. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2012. 287:3241-3248. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Effects of adenylates on the circadian interaction of KaiB with the KaiC complex in the reconstituted cyanobacterial Kai protein oscillator. Kazuhito Goda, Takao Kondo, and Tokitaka Oyama. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014 78:1833-1838(http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2014.940833)

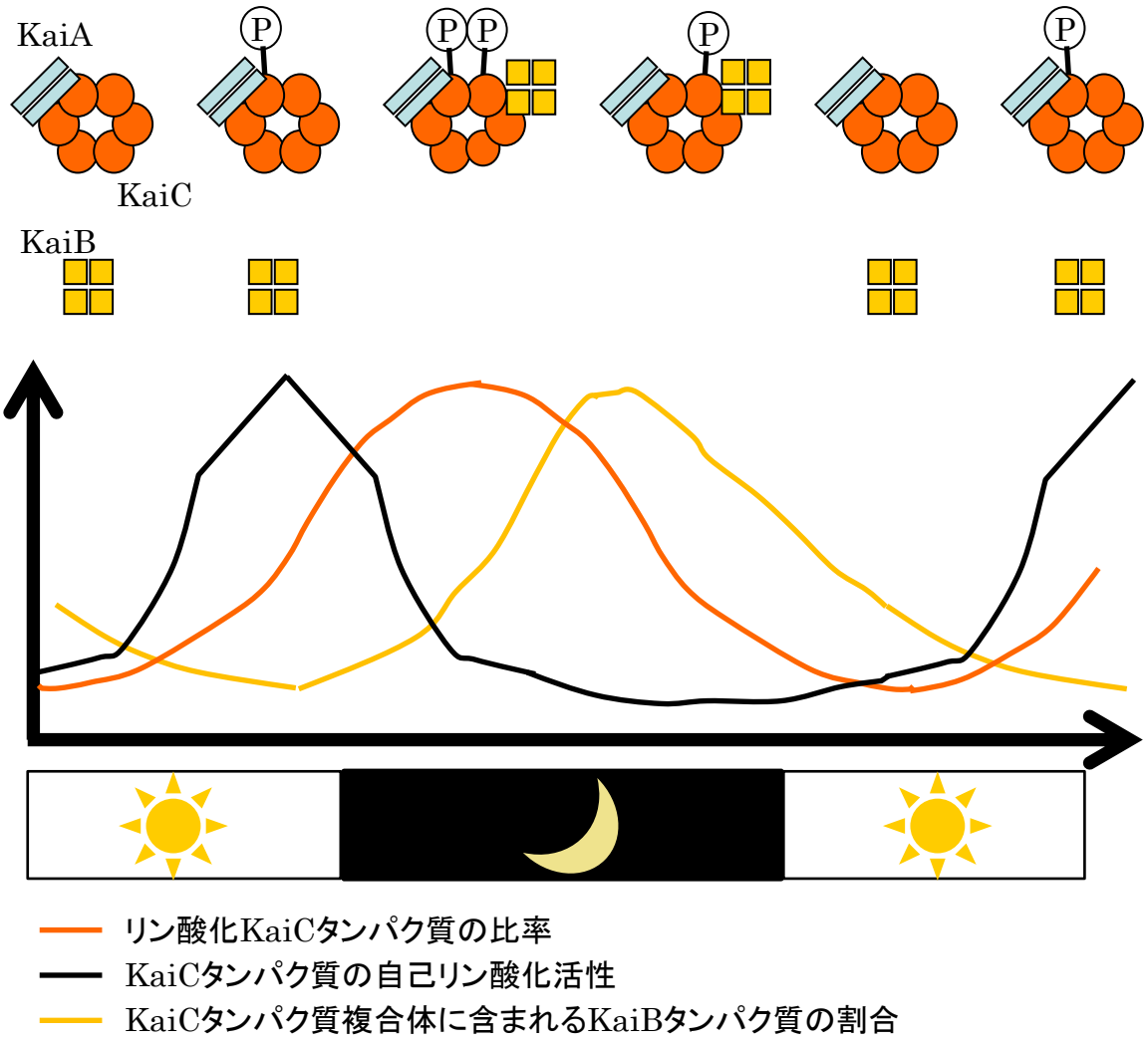


図1　Kaiタンパク質のダイナミックな挙動の模式図

シアノバクテリアのKaiタンパク質振動体において観察される周期的な変動を示すKaiタンパク質群の状態や活性。リン酸化KaiCタンパク質の比率、KaiCタンパク質の自己リン酸化活性、KaiCタンパク質複合体に含まれるKaiBタンパク質の割合を代表的な変動指標として示した。明暗周期下のシアノバクテリア細胞のKaiタンパク質群の状態や活性はグラフの下の明暗周期に対応している。

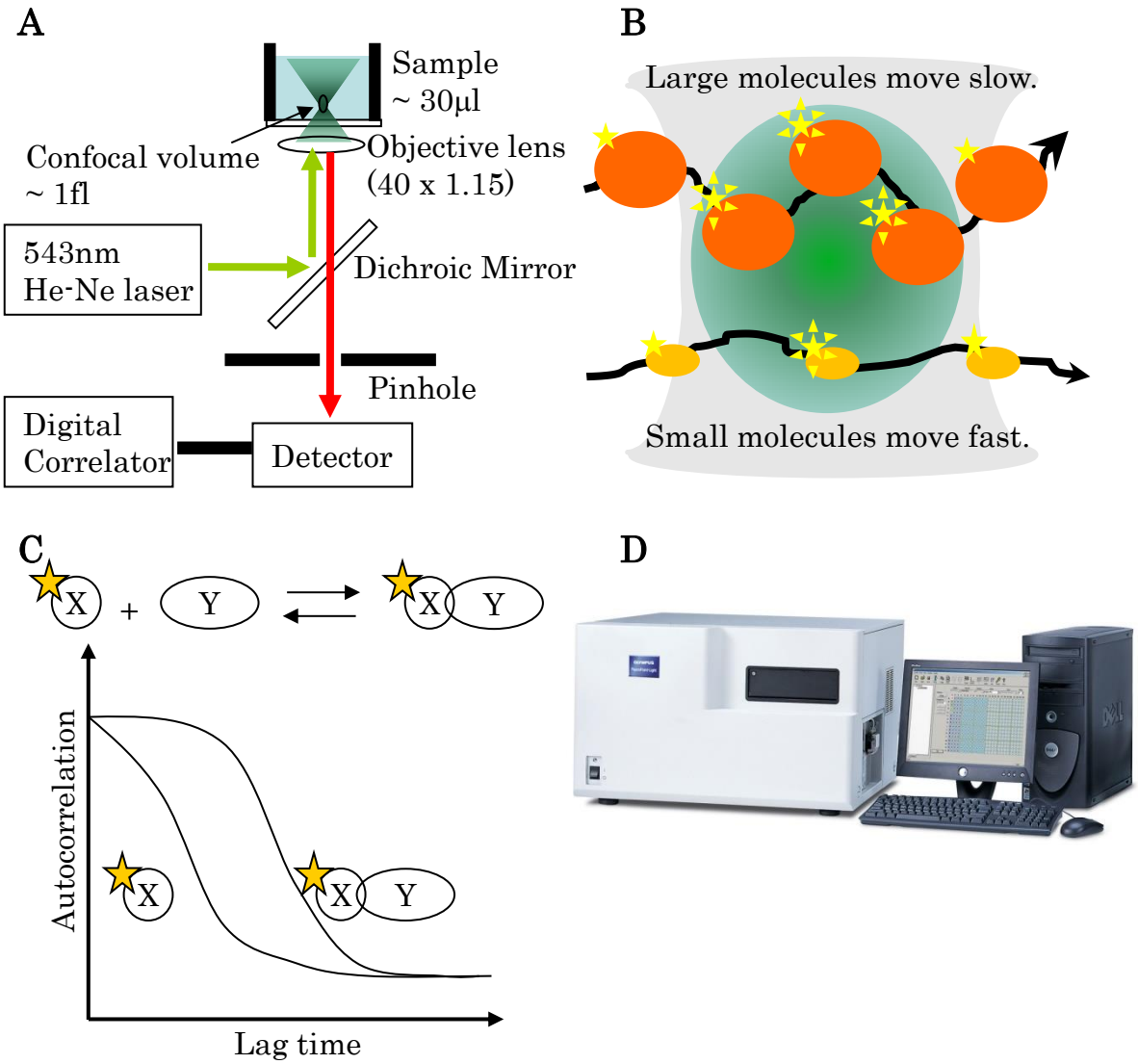
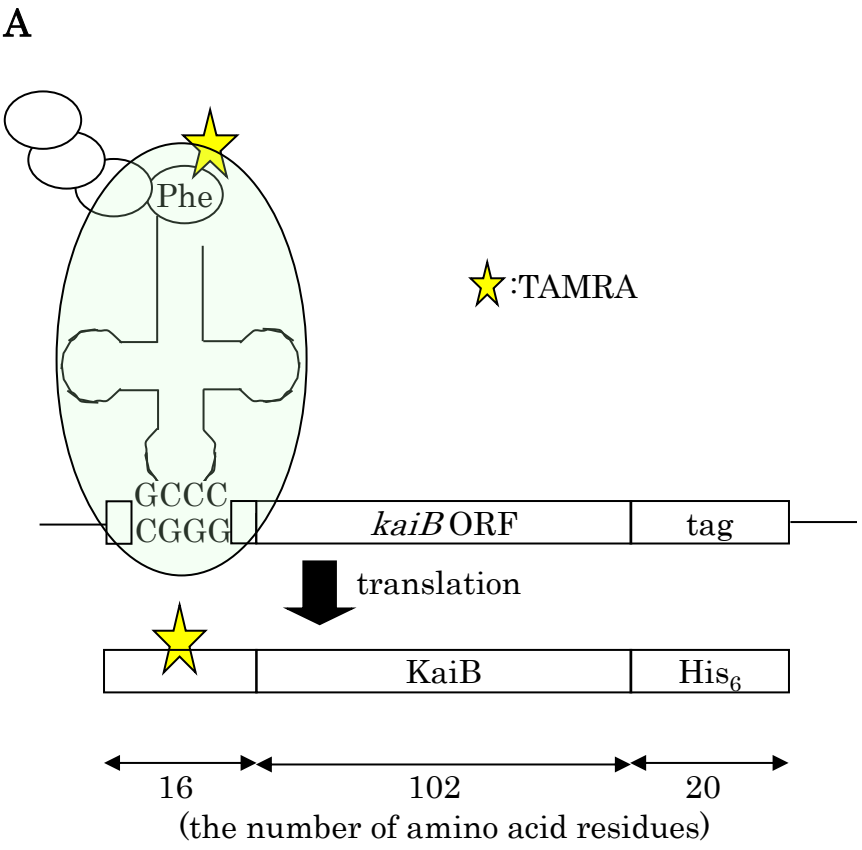
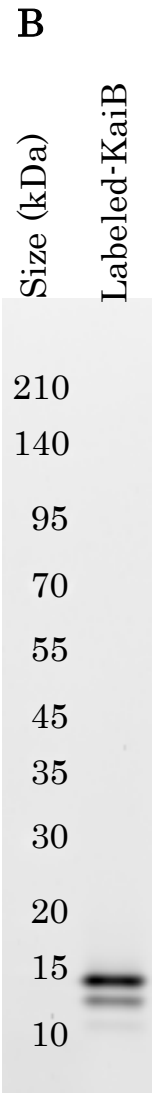


図2　蛍光相関分光法の模式図

A. 一分子蛍光分析システムMF20（オリンパス社）内の蛍光相関分光解析ユニット。543 nmのHe-Neレーザー光は対物レンズを通して集光され、蛍光標識したタンパク質を励起する。微小な焦点領域（約1fl）からの蛍光はピンホールを通って、検出器に到達する。検出されたシグナルはデジタル相関器によって解析される。B. 焦点領域における蛍光分子のブラウン運動の模式図。大きい分子は拡散が遅く、小さい分子は拡散が早い。C. 蛍光標識されたタンパク質に対する結合により生じた蛍光相関の変化の模式図。蛍光シグナルの揺らぎは自己相関関数によって解析され、並進拡散時間が算出される。蛍光標識された分子が大きくなれば相関曲線は右側にシフトする。蛍光標識された分子（X）が非標識の分子（Y）と結合すると（XY）、並進拡散時間は結合していない状態（X）の並進拡散時間よりも長くなる。D. 一分子蛍光分析システムMF20の外観。


A
Phe
:TAMRA
GCCC
CGGG
kaiB ORF
tag
translation
KaiB
His6
16
102
20
(the number of amino acid residues)


B
Size (kDa)
Labeled-KaiB
210
140
95
70
55
45
35
30
20
15
10

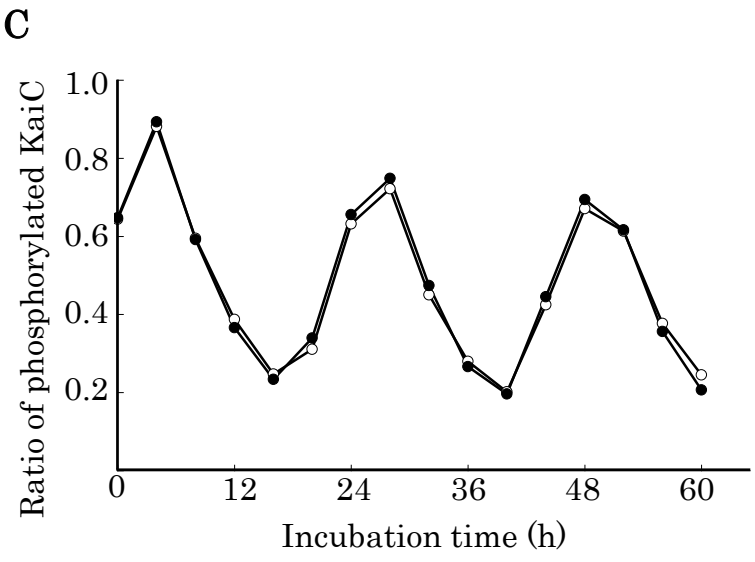

C
Ratio of phosphorylated KaiC
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
12
24
36
48
60
Incubation time (h)

図3　蛍光標識KaiBタンパク質プローブの調製

A. 4塩基コドンを利用した無細胞タンパク質合成系により、部位特異的に蛍光アミノ酸を取り込ませた TAMRA-KaiB-His_6合成の模式図。TAMRA-KaiB-His_6 はN末端側に付加した16残基中の9残基目にTAMRA-X-aminophenylalanine を持ち、続いてKaiBタンパク質由来の102残基、C末端側にヒスチヂンタグを含む20残基を持つ。B. SDS-PAGEによるTAMRA-KaiB-His_6の検出。ゲルろ過後の分画液から2μlを取り、10–20% の濃度勾配ゲルで分析した。ゲル中のTAMRA由来の蛍光シグナルは Typhoon 9400 system (GE Healthcare社)で可視化した。左はタンパク質のサイズによるおおよその泳動距離である。C. 蛍光標識KaiBタンパク質を含んだKaiタンパク質振動体再構成溶液中のリン酸化KaiCの割合。再構成溶液はTAMRA-KaiB-His_6を添加した溶液と添加してない溶液を準備し、30°C一定の条件で60時間インキュベーションした。4時間毎に一定量を分取し、SDS-PAGEでリン酸化KaiCの量を計測した。黒丸と白丸はそれぞれTAMRA-KaiB-His_6を添加した溶液と添加してない溶液中の全KaiCタンパク質量に対するリン酸化KaiCタンパク質の量を示す。

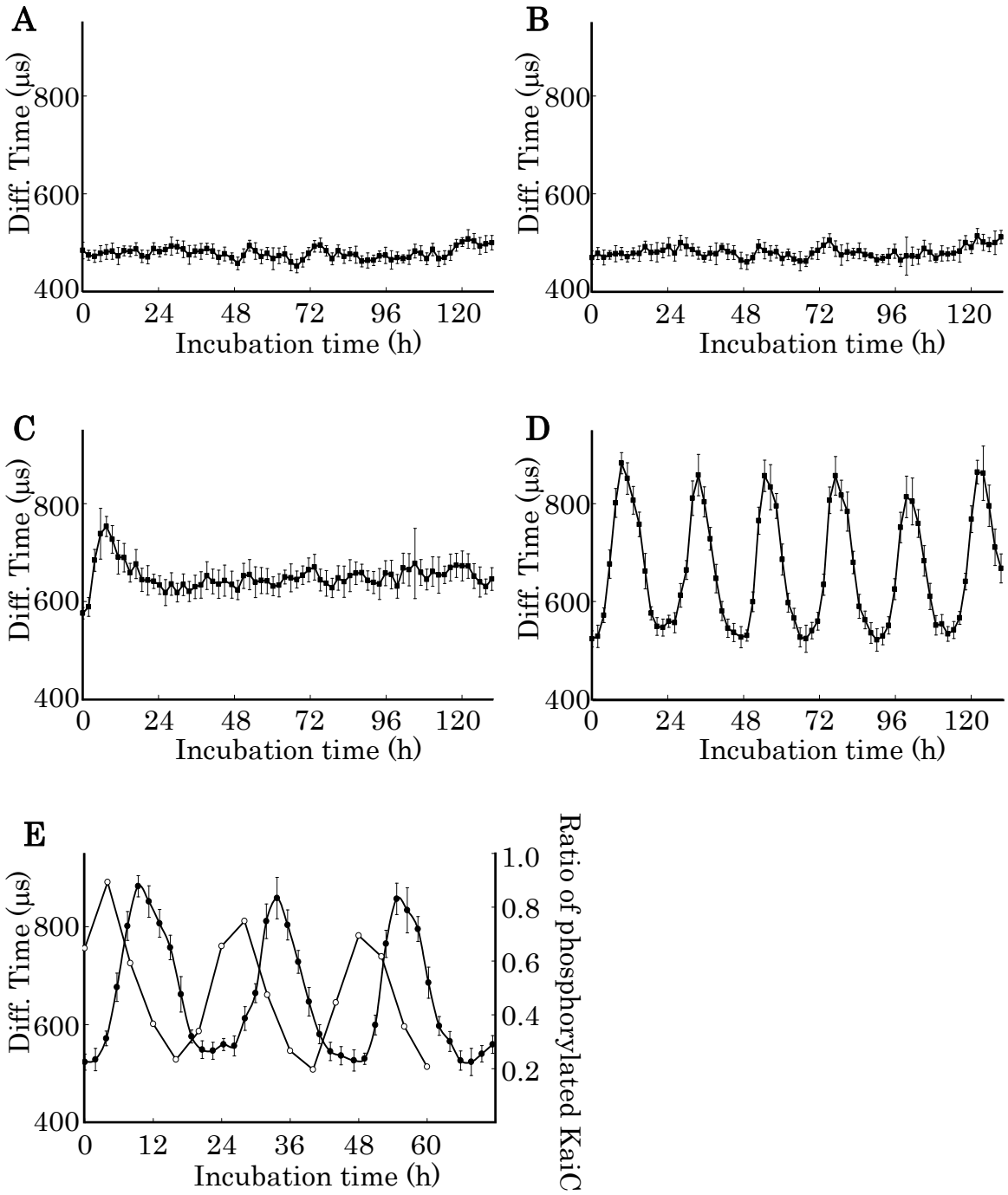

A
B
C
D
E
Diff. Time (μs)
800
600
400
0
24
48
72
96
120
Incubation time (h)
12
36
60
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
Ratio of phosphorylated KaiC

図4　蛍光相関分光法によるKaiタンパク質振動体再構成溶液中の概日振動の検出

A–D. 蛍光相関分光法により得られた5日間以上にわたるTAMRA–KaiB–His_6の並進拡散時間の変動。それぞれAはTAMRA–KaiB–His_6と3.5 μM KaiBを含む溶液、BはTAMRA–KaiB–His_6と1.2 μM KaiA、3.5 μM KaiBを含む溶液、CはTAMRA–KaiB–His_6と3.5 μM KaiB、3.5 μM KaiCを含む溶液、DはTAMRA–KaiB–His_6と1.2 μM KaiA、3.5 μM KaiB、3.5 μM KaiCを含む溶液（再構成溶液）を解析したデータである。E. 再構成溶液中のTAMRA–KaiB–His_6の並進拡散時間とリン酸化KaiCタンパク質量の振動。それぞれ黒丸は並進拡散時間、白丸はリン酸化KaiCタンパク質の比率を表す。Kaiタンパク質溶液中のTAMRA–KaiB–His_6の蛍光相関分光解析は2時間毎に行った。蛍光相関分光解析のデータは2回以上の独立した結果から代表的なデータを選択した。各データポイントは10回計測の平均値±標準偏差を表す。

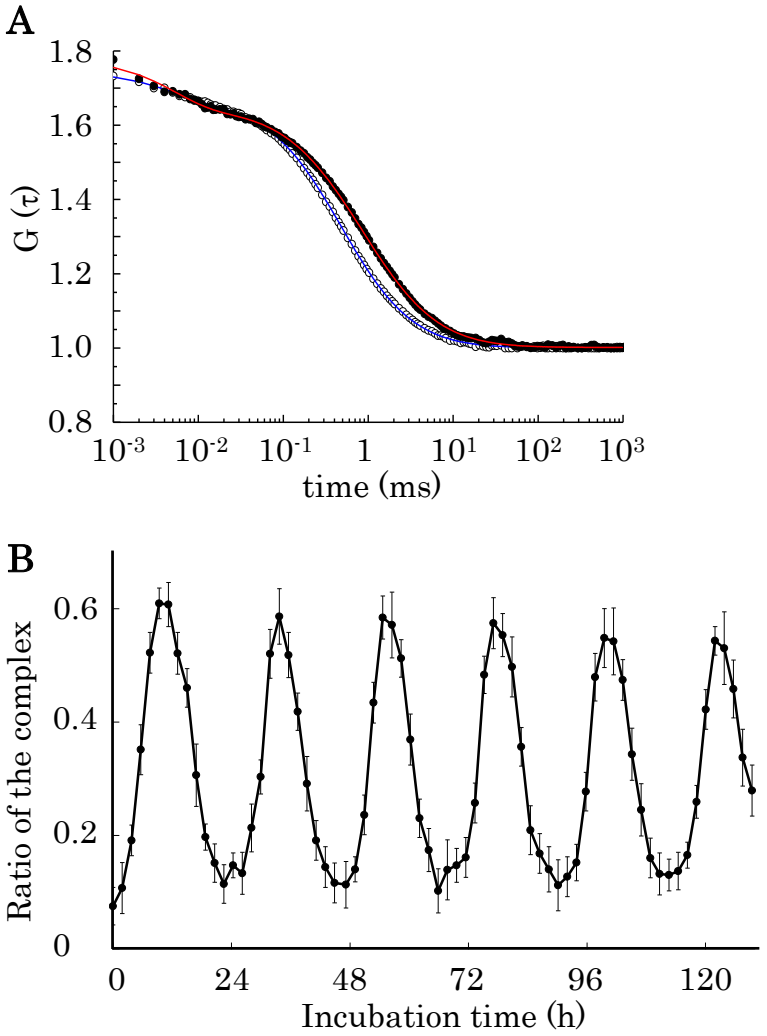


図5　蛍光相関分光法の2成分解析を用いたKaiCタンパク質複合体に含まれる蛍光標識KaiBタンパク質プローブの割合の算出

A. インキュベーション開始から9.4時間後のTAMRA-KaiB-His_6を含んだKaiタンパク質溶液の代表的な自己相関曲線。それぞれ白丸はTAMRA-KaiB-His_6とKaiBタンパク質を含んだ溶液（図4A）、黒丸はTAMRA-KaiB-His_6 をKaiタンパク質振動体再構成溶液に添加した溶液（図4D）に該当する。 TAMRA-KaiB-His_6とKaiBタンパク質のみを含んだ溶液は蛍光相関分光解析の1成分解析モデルで解析し、並進拡散時間が482.5 ± 16.6 μsと算出された(青い適合曲線)。TAMRA-KaiB-His_6 を再構成溶液に添加した溶液は蛍光相関分光解析の2成分解析モデルで解析した（赤い適合曲線）（「実験材料と方法」の項参照）。解析時にはKaiCタンパク質複合体に取り込まれていない蛍光標識KaiBタンパク質の並進拡散時間（τ_{free}）を482.5 μsとして固定した。B. KaiCタンパク質複合体と結合したKaiBタンパク質の割合の概日振動。割合の算出は、図4Dと同じデータセットを用いて行った。

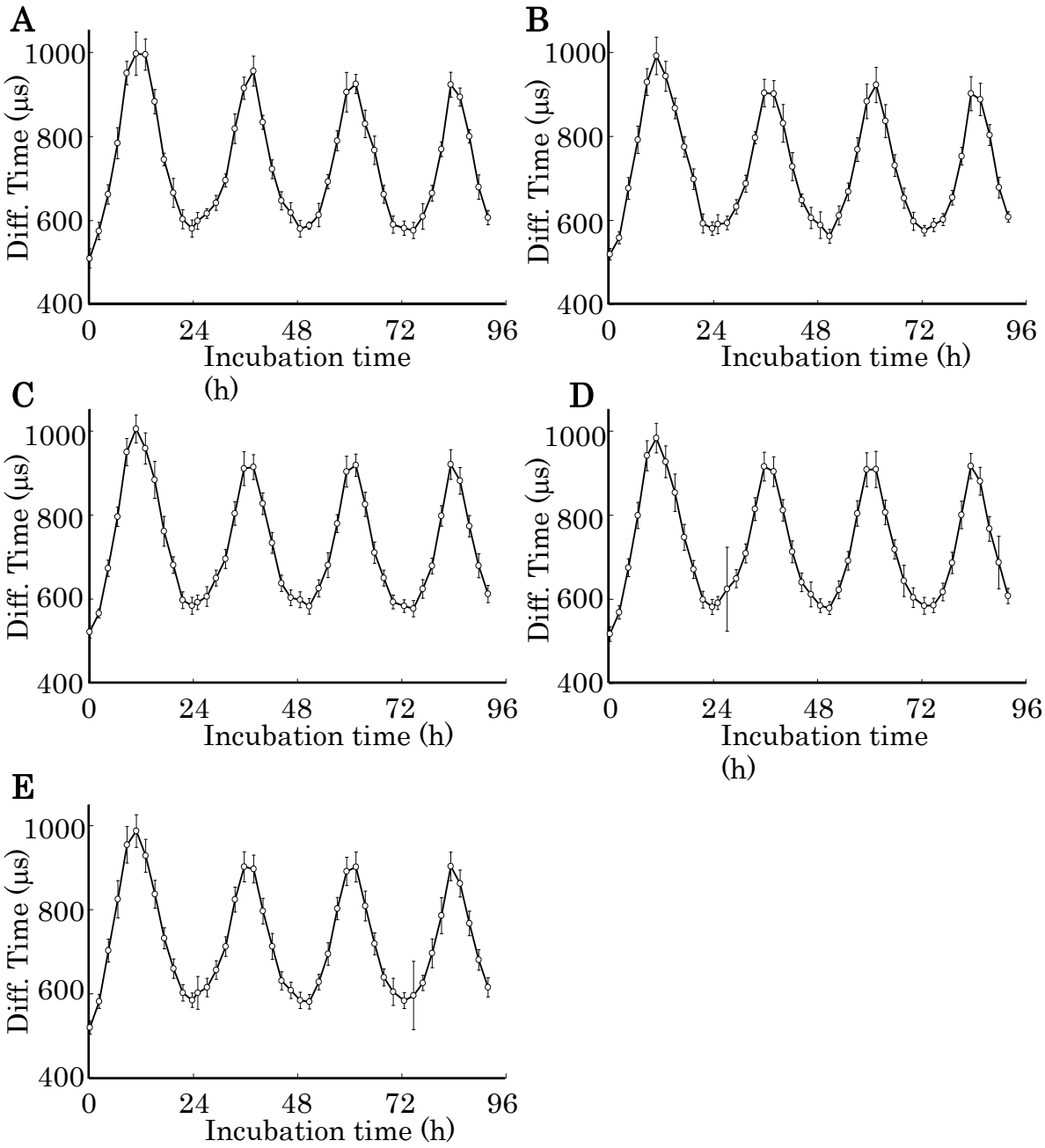


図6 レーザー光の照射時間の延長による並進拡散時間の振動に与える影響

TAMRA-KaiB-His_6を含んだKaiタンパク質振動体再構成溶液は2時間毎に4日以上蛍光相関分光法による計測を行い、並進拡散時間を算出した。各データポイントにおける計測時間と回数はそれぞれ15秒5回（A）、15秒10回（B）、15秒20回（C）、15秒50回（D）、15秒100回（E）である。各データポイントは、それぞれの解析時の並進拡散時間の平均値±標準偏差を示している。

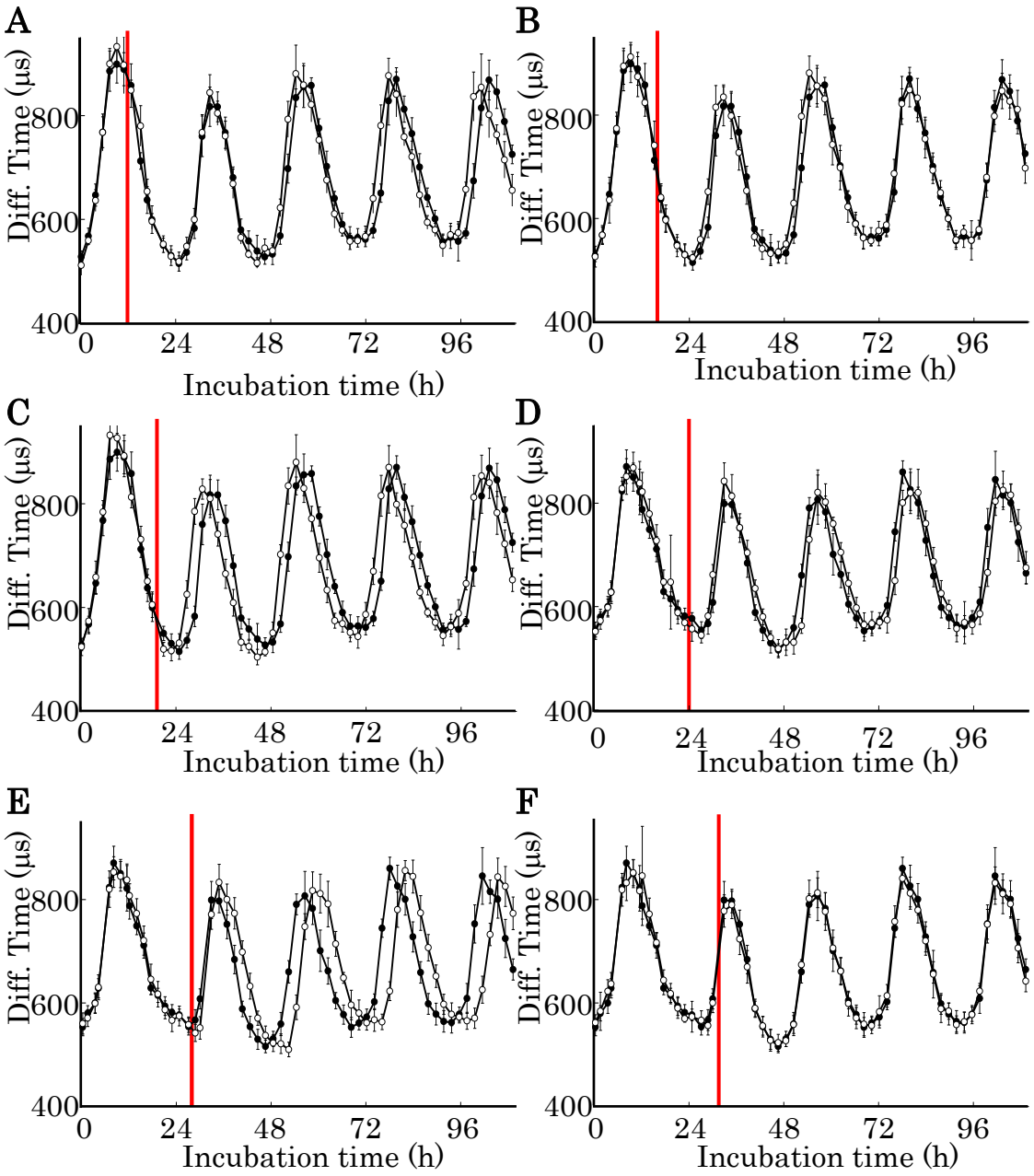


図7　高温パルス刺激に対する位相応答の検出

Kaiタンパク質振動体再構成溶液に高温パルス刺激（50°C、30分間）を与えた。刺激を与えたタイミングは、それぞれインキュベーション開始から12時間後（A）、16時間後（B）、20時間後（C）、24時間後（D）、28時間後（E）、32時間後（F）である。各パネルにおいて白丸は刺激を与えた再構成溶液の並進拡散時間を、黒丸は刺激を与えていない再構成溶液の並進拡散時間を表す。赤いバーは高温パルス刺激の時間帯を表す。各データポイントは10回計測の平均値±標準偏差を表す。パネルA、B、Cで用いた再構成溶液とパネルD、E、Fで用いた再構成溶液は異なるアリコートである。

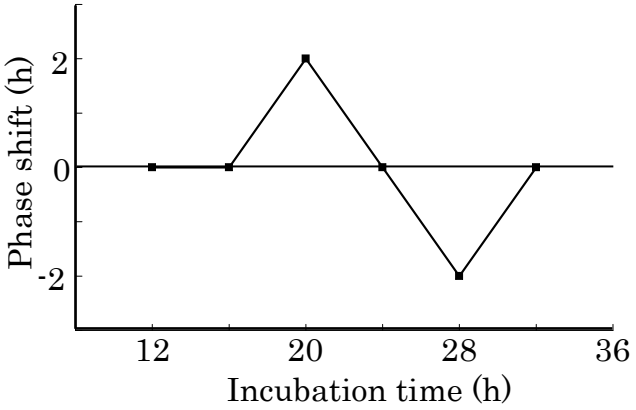


図8　高温パルス刺激に対する位相応答

Kaiタンパク質振動体再構成溶液に高温パルス刺激を与えた時の位相応答量（時間）のまとめ。インキュベーション開始から20時間後と28時間後でそれぞれ2時間の位相前進と2時間の位相後退が観測される。それ以外のタイミングでは位相変化は見られなかった。

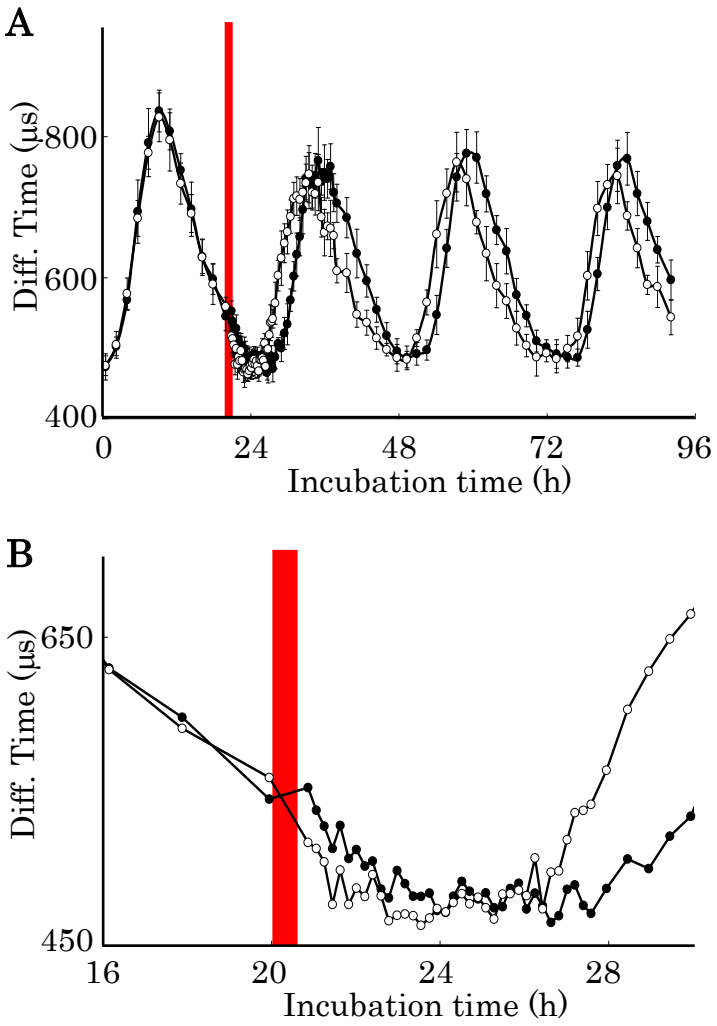


図9　高温パルス刺激に対する位相応答の詳細な解析

A. インキュベーション開始から20時間後に与えた高温パルス刺激に応答した並進拡散時間の変化。計92時間のインキュベーション時間の内、最初の20時間と最後の52時間は、約2時間毎にデータを取得した。その他の時間帯は、それぞれ20時間から27時間の間は10分毎に、27時間と40時間の間は30分毎にデータを取得した。白丸は刺激を与えた再構成溶液の並進拡散時間を、黒丸は刺激を与えていない再構成溶液の並進拡散時間を表す。赤いバーは高温パルス刺激の時間帯を表す。B. Aのグラフのインキュベーション開始から22時間後前後の拡大図。

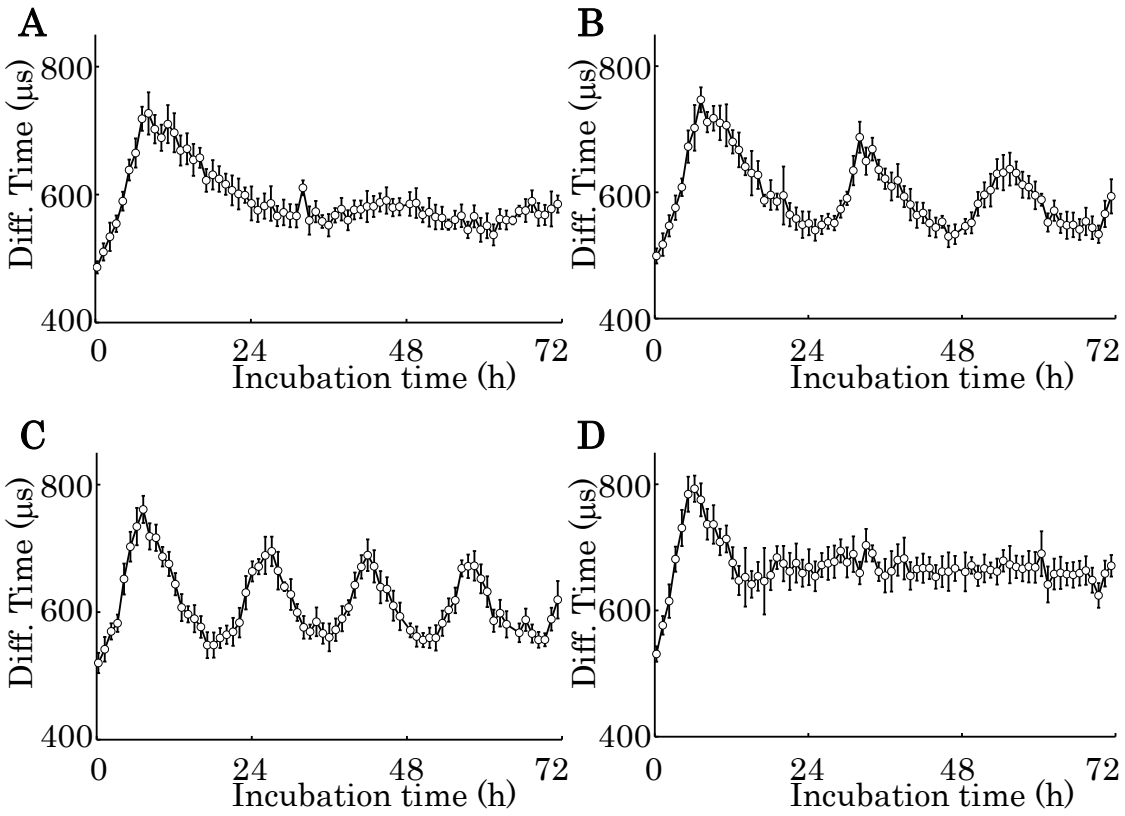


図10　異なるATP濃度存在下でのKaiBタンパク質とKaiCタンパク質複合体の相互作用の変動

ATP濃度の異なるKaiタンパク質振動体再構成溶液中で蛍光標識KaiBタンパク質プローブの並進拡散時間を蛍光相関分光解析で算出した。ATP濃度はそれぞれA. 1 mM、B. 4 mM、C. 8 mM、D. 10 mMである。各データポイントは、10回計測の並進拡散時間の平均値±標準偏差を表す。

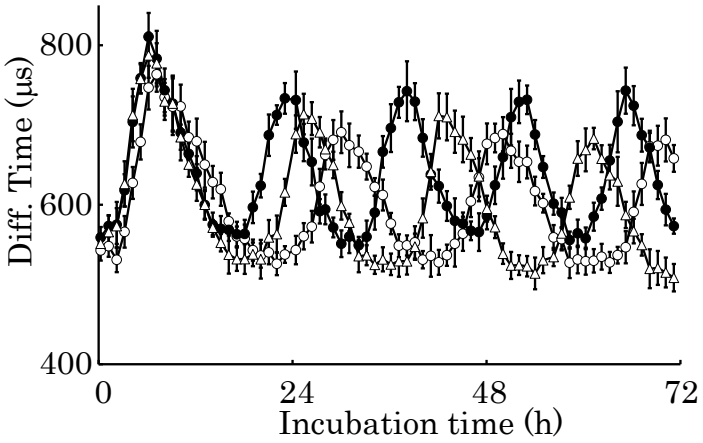


図11　Kaiタンパク質再構成溶液中のKaiBタンパク質とKaiCタンパク質複合体の相互作用の変動に対するATPもしくはADP添加の影響

ATP、ADP濃度の異なるKaiタンパク質振動体再構成溶液中で蛍光標識KaiBタンパク質プローブの並進拡散時間を蛍光相関分光解析で算出した。それぞれ白丸は4 mM ATP添加時の、黒丸は8 mM ATP添加時の、白三角は4 mM ATPと4 mM ADP添加時の蛍光標識KaiBタンパク質の並進拡散時間を示している。各データポイントは、10回計測の並進拡散時間の平均値±標準偏差を表す。

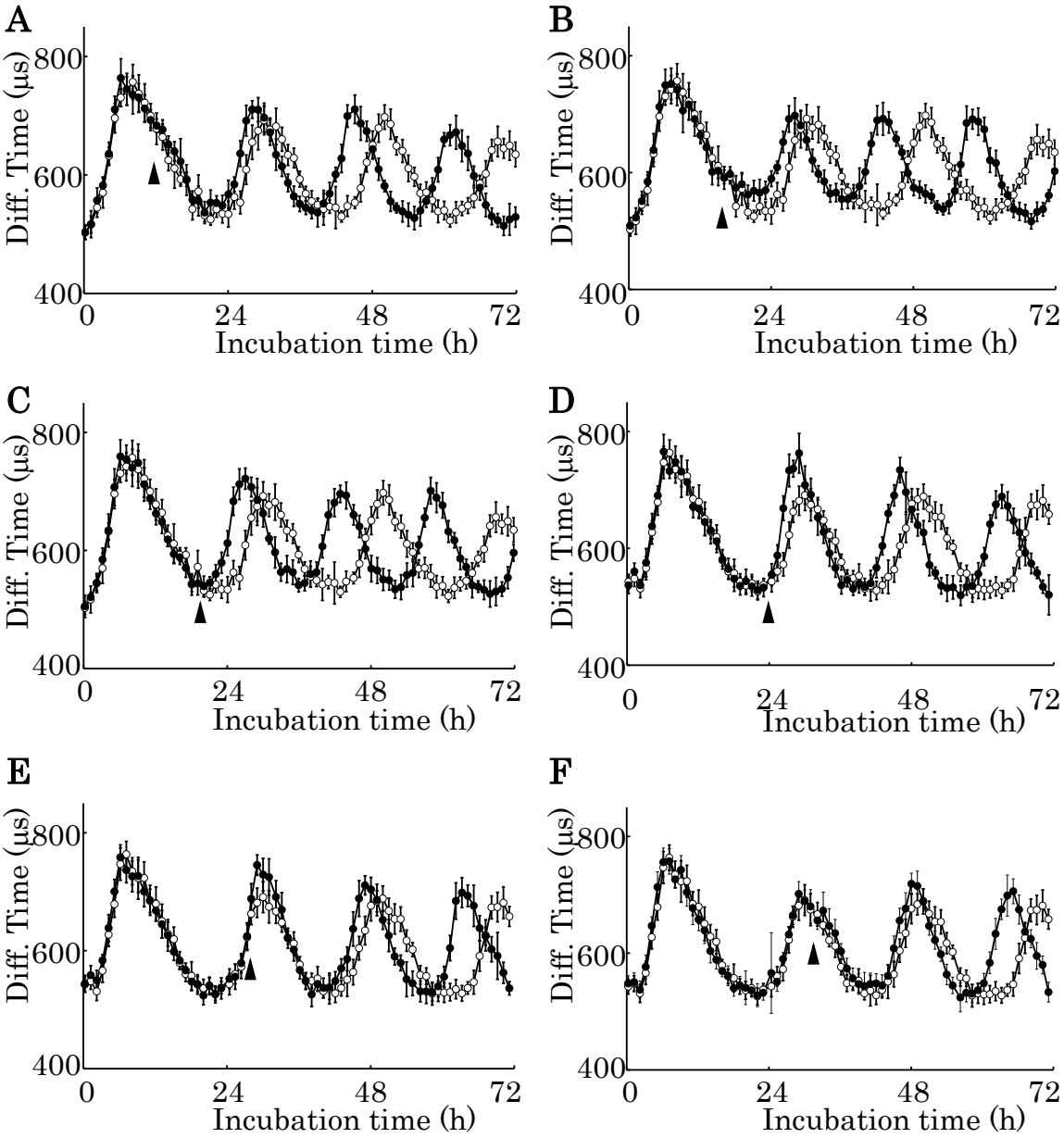


図12　Kaiタンパク質再構成溶液中のKaiBタンパク質とKaiCタンパク質複合体の相互作用の変動に対するADP添加の位相依存的な影響

Kaiタンパク質振動体再構成溶液に対して、インキュベーション開始から12時間後（A）、16時間後（B）、20時間後（C）、24時間後（D）、28時間後（E）、32時間後（F）の各タイミングでADPを添加した。それぞれ白丸はコントロールの再構成溶液中の、黒丸はADPを添加した再構成溶液中の蛍光標識KaiBタンパク質プローブの並進拡散時間を示している。コントロールの再構成溶液にはADP添加と同じタイミングで等量の蒸留水を添加した。各パネルの矢頭はADPを添加したタイミングを表す。各データポイントは、10回計測の並進拡散時間の平均値±標準偏差を表す。

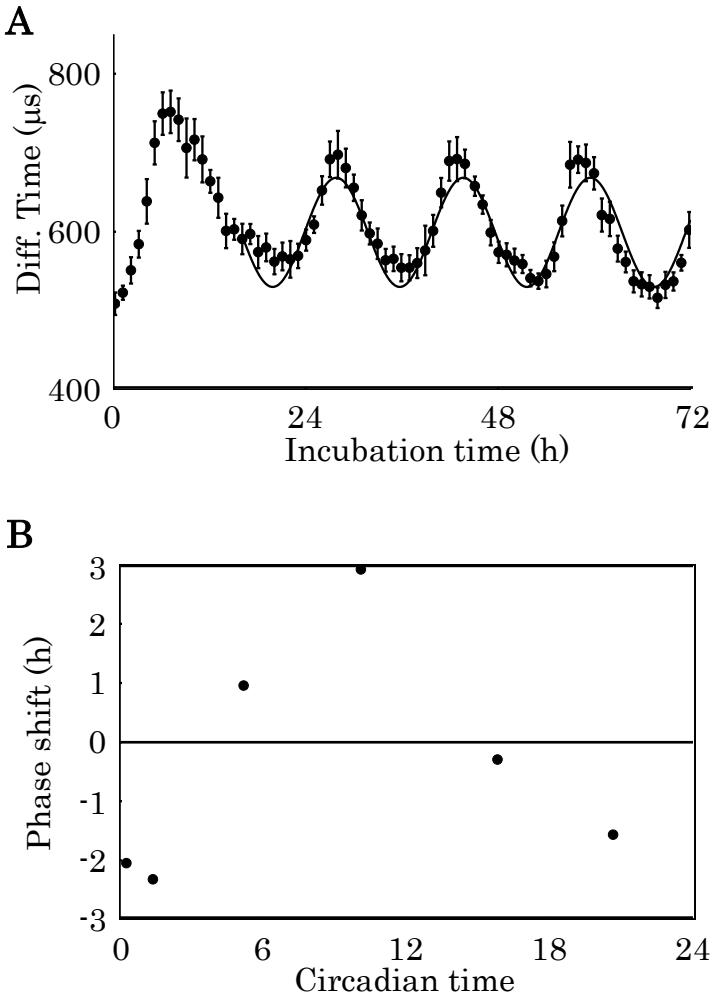


図13　ADP添加の位相依存的な影響に関する数理解析

A. 並進拡散時間の時系列データを正弦関数曲線に適合させた例を示す。実線はインキュベーション開始から16時間後にADPを添加した再構成溶液中の蛍光標識KaiBタンパク質プローブの並進拡散時間の時系列データに適合させた曲線を表す。黒丸は図12Bと同じデータを表す。B. ADP添加による位相シフト量をプロットした。各プロットの元のデータの算出方法の詳細は、「実験材料と方法」に記した。

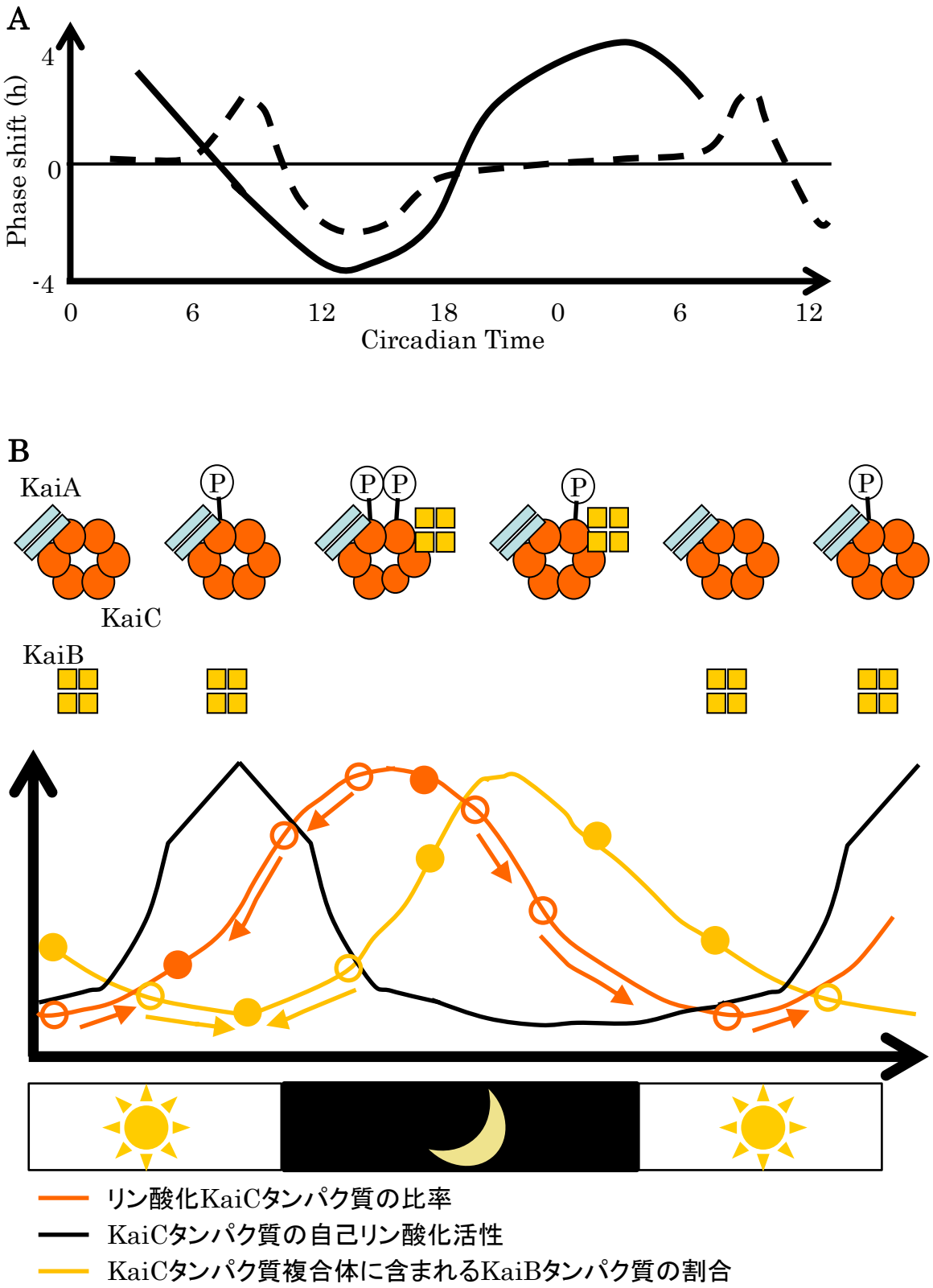

A
Phase shift (h)
4
0
-4
0
6
12
18
0
6
12
Circadian Time
B
KaiA
P
P
P
P
P
KaiC
KaiB
リン酸化KaiCタンパク質の比率
KaiCタンパク質の自己リン酸化活性
KaiCタンパク質複合体に含まれるKaiBタンパク質の割合

図14　高温パルス刺激による位相応答

A. 高温パルス刺激によるKaiタンパク質振動体の位相応答曲線。実線が吉田らの発表（45°C、4時間）において示された位相応答曲線（Yoshida *et al.*, 2009）。破線は、本研究において行った高温パルス刺激（50°C、30分間）の位相応答結果から予想される位相応答曲線を吉田らの作成した座標にあてはめた（図8）。概日時間（Circadian Time）16がリン酸化KaiCタンパク質比率のピークの位相と一致する。B. 高温パルス刺激実験において得られた各データの位相応答の変化方向の模式図。Kaiタンパク質振動体においてリン酸化KaiCタンパク質の比率とKaiCタンパク質複合体に含まれるKaiBタンパク質の割合に対して位相応答の様子を図示した。橙枠丸と橙丸は吉田らの先行研究において、それぞれ位相変化が見られる位相と位相変化が見られない位相を示している。橙矢印は位相の変化する向きを示している。黄枠丸と黄丸は本研究において、それぞれ位相変化が見られる位相と位相変化が見られない位相を示している。黄矢印は位相の変化する向きを示している。どちらの刺激実験においてもKaiCタンパク質の自己リン酸化活性がピークに達する時刻に向かって位相応答が進んでいることがわかる。明暗周期下のシアノバクテリア細胞のKaiタンパク質群の状態や活性はグラフの下の明暗周期に対応している。

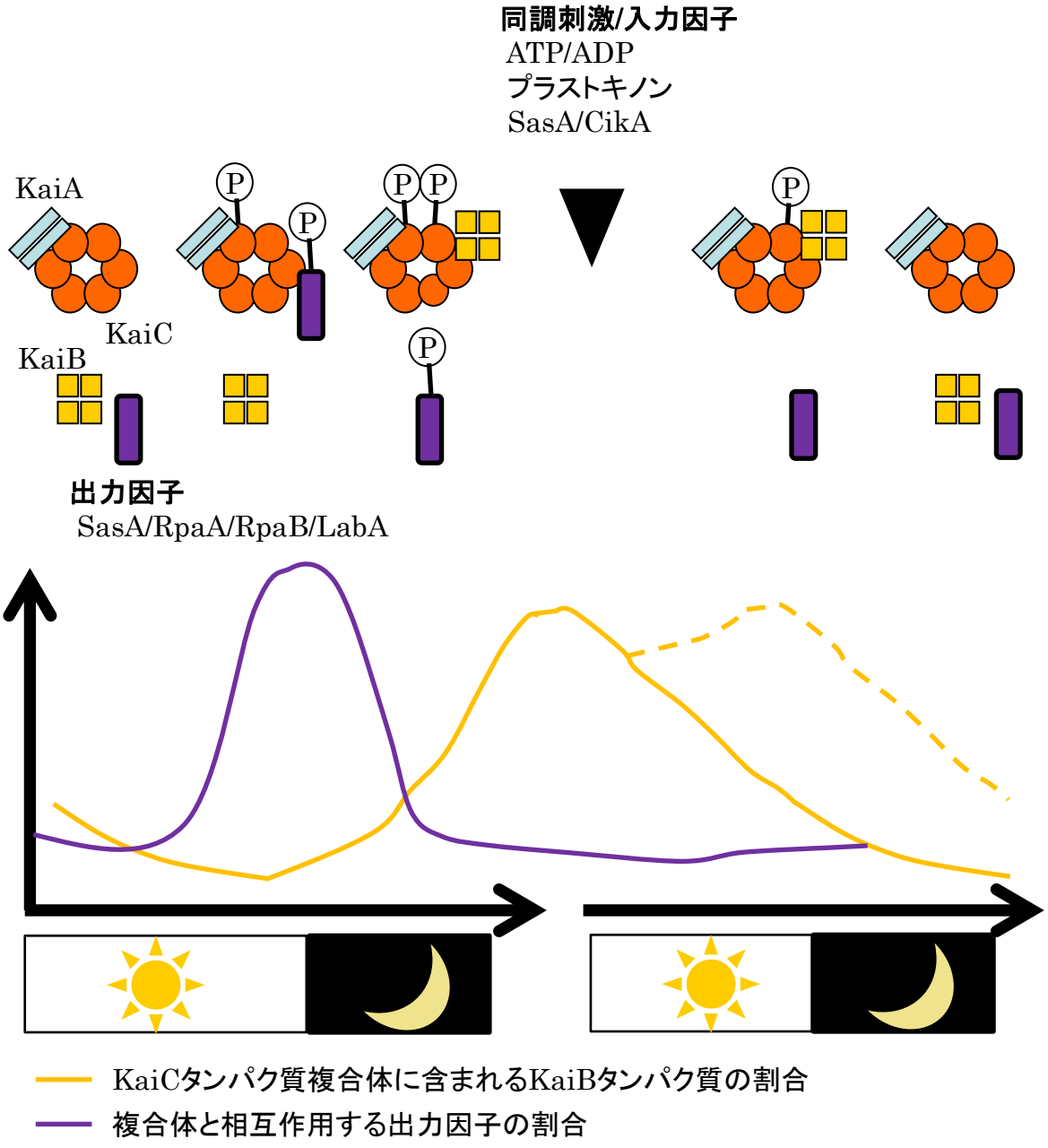


図15　本モニタリング法を利用した概日時計システム解析の発展型

同調刺激によるKaiタンパク質振動体の同調過程の観測及びKaiタンパク質振動体からの時刻情報を受け取る出力因子の観測の模式図。KaiCタンパク質複合体によりリン酸化制御を受ける出力因子の存在が知られている。明暗周期下のシアノバクテリア細胞のKaiタンパク質群の状態や活性はグラフの下の明暗周期に対応している。